202104598

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本　(11)公開編號：TW 202104598 A

(43)公開日：中華民國 110 (2021) 年 02 月 01 日

(21)申請案號：109111543　(22)申請日：中華民國 109 (2020) 年 04 月 06 日

(51)Int. Cl.：*C12Q1/68 (2018.01)*　*C12Q1/6813 (2018.01)*
C12Q1/6876 (2018.01)　*C12Q1/6886 (2018.01)*
G01N21/25 (2006.01)　*G01N21/31 (2006.01)*
G01N21/33 (2006.01)　*G01N21/62 (2006.01)*
G01N21/64 (2006.01)

(30)優先權：2019/04/05　南韓　10-2019-0039974
2019/11/29　南韓　10-2019-0157368

(71)申請人：南韓商健諾心理股份有限公司 (南韓) GENOPSY CO., LTD.　(KR)
南韓

(72)發明人：曹榮南 CHO, YOUNGNAM (KR)

(74)代理人：劉法正；尹重君

申請實體審查：無　申請專利範圍項數：300 項　圖式數：177　共 388 頁

(54)名稱

使用 cfDNA 之癌症診斷方法

(57)摘要

本發明的診斷方法係關於一種技術，其中小型 cfDNA 經濃縮並單離自例如尿液、腦脊髓液、血漿、血液、肋膜積液或體液之液體樣本，然後在無 PCR 之下以超高敏感性偵測特定癌症中過度表現之生物標記。根據本發明之實施例的偵測方法不需要 PCR 擴增反應，於是可大幅地減少診斷癌症所花費的時間。此外，由於其可在現場直接分析，因而其可用作在短時間內同時搜尋眾多基因之定點照護檢測(Point-Of-Care Testing, POCT)。

The diagnostic method of the present invention relates to a technique in which small-sized cfDNA is concentrated and isolated from a liquid sample such as urine, cerebrospinal fluid, plasma, blood, pleural fluid, or body fluid, and then a biomarker overexpressed in a specific cancer is detected with ultra-high sensitivity without PCR. The detection method according to an example of the present invention does not require a PCR amplification reaction and thus can greatly reduce time taken to diagnose cancer. In addition, since it can be directly analyzed in the field, it can be used as a point-of-care testing (POCT) that can simultaneously search a large number of genes within a short time.

202104598

【發明摘要】

【中文發明名稱】

使用cfDNA之癌症診斷方法

【英文發明名稱】

DIAGNOSIS METHOD OF CANCER USING CFDNA

【中文】

本發明的診斷方法係關於一種技術，其中小型 cfDNA 經濃縮並單離自例如尿液、腦脊髓液、血漿、血液、肋膜積液或體液之液體樣本，然後在無 PCR 之下以超高敏感性偵測特定癌症中過度表現之生物標記。根據本發明之實施例的偵測方法不需要 PCR 擴增反應，於是可大幅地減少診斷癌症所花費的時間。此外，由於其可在現場直接分析，因而其可用作在短時間內同時搜尋眾多基因之定點照護檢測(Point-Of-Care Testing, POCT)。

【英文】

The diagnostic method of the present invention relates to a technique in which small-sized cfDNA is concentrated and isolated from a liquid sample such as urine, cerebrospinal fluid, plasma, blood, pleural fluid, or body fluid, and then a biomarker overexpressed in a specific cancer is detected with ultra-high sensitivity without PCR. The detection method according to an example of the present invention does not require a PCR amplification reaction and thus can greatly reduce time taken to diagnose cancer. In addition, since it can be directly analyzed in the field, it can be used as a point-of-care testing (POCT) that can simultaneously search a large number of genes within a short time.

【指定代表圖】　(無)

【代表圖之符號簡單說明】

(無)

【特徵化學式】

(無)

【發明說明書】

【中文發明名稱】

使用cfDNA之癌症診斷方法

【英文發明名稱】

DIAGNOSIS METHOD OF CANCER USING CFDNA

【技術領域】

【0001】本發明係關於一種使用具有一雙螺旋結構之游離DNA (cell-free DNA)診斷癌症的方法，更具體地，本發明係關於一種在不擴增之下偵測在癌症中特異地表現或過度表現的一生物標記基因的方法，以及一種使用其之裝置。

【先前技術】

【0002】近來，癌症疾病的早期診斷的重要性已大幅地受到全世界重視。因此，對於癌症的早期診斷方法的研究逐漸增加。然而，到目前為止，用於診斷癌症的方法是藉由例如收集組織樣本和內視鏡檢查的侵入性方法來進行。特別是，切片活檢是藉由提取疑似疾病區域的一部分並在顯微鏡下觀察來進行。因此，為了使用針頭、打孔器、內視鏡或腹腔鏡收集組織樣本，人體必須被切開，於是，患者感受到相當大的不適，而且留下耗費長時間才能恢復的疤痕。

【0003】作為侵入性診斷及檢測方法的替代方案，使用液態活檢之分子診斷方法已引起關注。由於液態活檢使用非侵入性方法，所以可快速確認檢測結果。此外，不同於僅能分析疾病之一部分的組織樣本，液態活檢能從各種角度對疾病進行分析。特別是，液態活檢被預期在癌症診斷中發揮優越效用。特別是，預期僅藉由檢查例如血液和尿液之體液來分析存在於各個身體部位的血液中之衍生自癌細胞的DNA，將有可能詳細觀察癌症發生及轉移等。

【0004】分子診斷方法是體外診斷的代表性技術，而且是藉由透過數值或

成像來偵測例如血液和尿液之含有遺傳資訊的樣本中的DNA或RNA的變化的診斷技術。由於此具有高準確性且不需要切片活檢的優點，基於其節省成本以及基因組分析技術快速發展之優點，已嘗試將其應用於癌症診斷技術。

【0005】 同時，游離DNA (cell-free DNA，下文稱作cfDNA)意指存在於血漿中之衍生自細胞的DNA。cfDNA通常具有雙螺旋結構，以及經常具有捲曲線圈結構。cfDNA可衍生自腫瘤細胞。此外，衍生自腫瘤細胞之cfDNA可在取自癌症患者的體液，例如血液、血漿或尿液中找到。

【0006】 在癌症患者中找到的cfDNA經常源於細胞壞死、細胞死亡或泌尿系統的正常細胞及/或癌細胞。此類cfDNA經由各種過程釋放至尿液、血液或類似物中。因此，隨著用於單離及偵測例如血液、血漿或尿液之生物樣本中之cfDNA的技術的發展，液態活檢被預期可成為用於監測處於癌症風險之患者的更有效且可靠的工具。特別是，由於尿液、腦脊髓液(CSF)、血漿、肋膜積液、腹水、血液或體液是容易取得的樣本，所以有可能藉由簡單且非侵入的方法經由重複採樣來收集大量樣本。

【0007】 然而，由於目前技術水準所致，藉由分析在例如血液或尿液之液體樣本中之cfDNA並偵測基因中存在的突變來早期診斷癌症的方法具有許多困難。因此，對於不僅是開發一種用於容易地偵測cfDNA之方法，還有用於增進偵測敏感性且準確地早期診斷癌症的技術係有所需求。

【0008】 同時，韓國專利第10-1751962號揭示了使用引子進行聚合酶鏈反應以偵測cfDNA，以及可使用能互補地結合至cfDNA的探針來定量cfDNA。然而，仍有需要分別的聚合酶及實驗設備與材料來進行聚合酶鏈反應的問題，且有現場診斷不易的問題。

【0009】 此外，韓國專利第10-1701618號揭示一種奈米結構，其中表面特性可藉由改變電場來改變，以有效地分離cfDNA。該奈米結構可經由電場變化而結

合或解離cfDNA，藉此從樣本容易分離出cfDNA。然而，仍有使用聚合酶鏈反應以確認存在哪種cfDNA的限制。

【0010】 為了藉由進行聚合酶鏈反應擴增cfDNA，不僅需要數種引子組，亦需要進行花費大量時間的繁複步驟。因此，已持續地執行研究，以克服必須進行PCR之限制以及開發用於以高準確性分析cfDNA之方法。

【0011】 此外，因為cfDNA在液體樣本中的位準極低，所以已持續地執行研究，以開發用於以高準確性及少量樣本獲取並分析DNA之方法以及有效的分析方法。

【發明內容】

技術問題

【0012】 以往，為了偵測cfDNA，必須使雙股cfDNA變性成單股DNA，俾使可結合互補至cfDNA的引子。因此，為了偵測cfDNA，施加熱的方法是必要的，而且以聚合酶反應的方法或類似方法是必要的。

【0013】 然而，本發明人已經發現，因為DNA轉錄過程在癌細胞中活躍地發生，所以有許多DNA區段，其中雙股DNA在轉錄期間退繞成單股，以及探針在即使沒有變性過程之下也能夠結合至從該些癌細胞釋放的cfDNA，基於該等發現，完成了本發明。

【0014】 因此，本發明的一個態樣提供一種在無PCR或核酸擴增過程之下使用具有互補於cfDNA的一序列之一探針來偵測在存在於例如血漿或尿液之液體樣本中之在癌細胞中特異地表現或過度表現的一生物標記的方法。

【0015】 根據另一態樣，本案提供的是一種在無PCR或核酸擴增過程之下偵測癌細胞生物標記之突變(例如SNP)的方法。

問題的解決方案

【0016】 為了達到上述目的，本發明的一個態樣提供一種用於診斷癌症的

方法，其藉由在不擴增之下偵測衍生自來自一樣本的癌細胞之一基因，其中該方法包含a)將單離自一個體之包含游離DNA (下稱cfDNA)的一生物樣本與一帶正電材料混合的一步驟；b)單離結合有cfDNA之該帶正電材料的一步驟；c)在混合物中依序地或同時地混合具有互補於該cfDNA的一序列之一探針與一標記的一步驟；d)移除未結合至cfDNA之該探針與該標記的一步驟；及e)偵測該標記的一步驟，其中該cfDNA係衍生自癌細胞，且具有互補於cfDNA的一序列之該探針係互補地結合至已知為一癌症生物標記之一基因，以及該方法是一種用於診斷癌症或預測癌症預後的方法。

發明功效

【0017】 本發明之用於診斷癌症的方法係關於一種技術，其中小型cfDNA係單離自例如尿液、腦脊髓液、血漿、血液、肋膜積液或體液之液體樣本，然後在無PCR之下以超高敏感性偵測在癌症中特異地表現或過度表現之生物標記。根據本發明之實施例的偵測方法不需要PCR擴增反應，於是可大幅地減少診斷癌症所花費的時間。此外，由於其可在現場直接分析，因而其可用作在短時間內同時搜尋眾多基因之定點照護檢測(POCT)。特別地，根據本發明的方法，由於有可能區別存在於正常人的血液中的cfDNA和存在於癌症患者的血液中的cfDNA，所以可有效地偵測各種癌症。

【圖式簡單說明】

【0018】 圖1a顯示帶正電奈米線(PEI/Ppy NW)的掃描電子顯微鏡(SEM)影像。

【0019】 圖1b顯示結合有HRP/鏈黴抗生物素蛋白(streptavidin)之奈米顆粒的掃描電子顯微鏡影像。

【0020】 圖2a顯示製備具有陽離子聚合物聚乙烯亞胺(PEI)結合至奈米結構表面之奈米結構(PEI/mPpy NW)以及使用其偵測和回收cfDNA之方法的概念示

意圖。

【0021】 圖2b是顯示用於各個過程之使用具有陽離子聚合物聚乙烯亞胺(PEI)結合至奈米結構表面之磁性奈米結構(PEI/mPpy NW)偵測和回收cfDNA之過程的照片的圖。

【0022】 圖3是顯示使用微量移液管回收cfDNA的過程的示意圖。

【0023】 圖4和圖5是顯示來自PD-L1陽性癌細胞株或PD-L1陰性癌細胞株的cfDNA之PD-L1 DNA表現和PD-L1 mRNA表現之測量位準的圖。

【0024】 圖6和圖7是顯示來自EpCAM陽性癌細胞株或EpCAM陰性癌細胞株的cfDNA之EpCAM DNA表現和EpCAM mRNA表現之測量位準的圖。

【0025】 圖8和圖9是顯示來自FOLR1陽性癌細胞株或FOLR1陰性癌細胞株的cfDNA之FOLR1 DNA表現和FOLR1 mRNA表現之測量位準的圖。

【0026】 圖10和圖11是顯示來自EGFR陽性癌細胞株或EGFR陰性癌細胞株的cfDNA之EGFR DNA表現和EGFR mRNA表現之測量位準的圖。

【0027】 圖12和圖13是顯示來自ERBB2陽性癌細胞株或ERBB2陰性癌細胞株的cfDNA之ERBB2 DNA表現和ERBB2 mRNA表現之測量位準的圖。

【0028】 圖14和圖15是顯示來自OGT陽性癌細胞株或OGT陰性癌細胞株的cfDNA之OGT DNA表現之測量位準的圖。

【0029】 圖16至18是顯示來自CEA陽性癌細胞株或CEA陰性癌細胞株的cfDNA之CEA DNA表現之測量位準的圖。

【0030】 圖19和圖20是顯示來自PSA陽性癌細胞株或PSA陰性癌細胞株的cfDNA之PSA DNA表現之測量位準的圖。

【0031】 圖21和圖22是顯示來自CA19-9陽性癌細胞株或CA19-9陰性癌細胞株的cfDNA之CA19-9 DNA表現之測量位準的圖。

【0032】 圖23和圖24是顯示來自CA125陽性癌細胞株或CA125陰性癌細胞

株的cfDNA之CA125 DNA表現之測量位準的圖。

【0033】 圖25和圖26是顯示來自AFP陽性癌細胞株或AFP陰性癌細胞株的cfDNA之AFP DNA表現之測量位準的圖。

【0034】 圖27至29是顯示使用取自前列腺癌患者的血漿之PSA、PSMA、PAP和PAC3的DNA表現之測量位準的圖。

【0035】 圖30至32是顯示使用取自正常人的血漿之PSA、PSMA、PAP和PAC3的DNA表現之測量位準的圖。

【0036】 圖33和圖34是顯示使用取自肺癌患者的血漿之NSE、SCC、CEA、Cyfra21-1和TPA的DNA表現之測量位準的圖。

【0037】 圖35是顯示使用取自正常人的血漿之NSE、SCC、CEA、Cyfra21-1和TPA的DNA表現之測量位準的圖。

【0038】 圖36至38是顯示使用取自甲狀腺癌患者的血漿之CEA、NSE、TG和CALCA的DNA表現之測量位準的圖。

【0039】 圖39和圖40是顯示使用取自正常人的血漿之CEA、NSE、TG和CALCA的DNA表現之測量位準的圖。

【0040】 圖41和圖42是顯示使用取自膀胱癌患者的尿液之OGT、FGFR3、TP53、NMP22和Cyfra21-1的DNA表現之測量位準的圖。

【0041】 圖43和圖44是顯示使用取自膀胱炎患者的尿液之OGT、FGFR3、TP53、NMP22和Cyfra21-1的DNA表現之測量位準的圖。

【0042】 圖45和圖46是顯示使用取自正常人的尿液之OGT、FGFR3、TP53、NMP22和Cyfra21-1的DNA表現之測量位準的圖。

【0043】 圖47和圖48是顯示使用取自乳癌患者的血漿之CA27-29、CA15-3和CEA的DNA表現之測量位準的圖。

【0044】 圖49和圖50是顯示使用取自正常人的血漿之CA27-29、CA15-3和

CEA的DNA表現之測量位準的圖。

【0045】 圖51和圖52是顯示使用取自大腸直腸癌患者的血漿之CEA和CA19-9的DNA表現之測量位準的圖。

【0046】 圖53至55是顯示使用取自正常人的血漿之CEA和CA19-9的DNA表現之測量位準的圖。

【0047】 圖56是顯示使用取自膽管癌患者的血漿之CA19-9、CA125和CEA的DNA表現之測量位準的圖。

【0048】 圖57和圖58是顯示使用取自正常人的血漿之CA19-9、CA125和CEA的DNA表現之測量位準的圖。

【0049】 圖59是顯示使用取自胃癌患者的血漿之CEA、CA19-9、CGB和Cyfra21-1的DNA表現之測量位準的圖。

【0050】 圖60和圖61是顯示使用取自正常人的血漿之CEA、CA19-9、CGB和Cyfra21-1的DNA表現之測量位準的圖。

【0051】 圖62至65是顯示使用取自胰臟癌患者的血漿之CA19-9、CA125和CEA的DNA表現之測量位準的圖。

【0052】 圖66至69是顯示使用取自正常人的血漿之CA19-9、CA125和CEA的DNA表現之測量位準的圖。

【0053】 圖70是顯示使用取自肺癌患者的血漿之CPT1A的DNA表現之測量位準的圖。

【0054】 圖71是顯示使用取自正常人的血漿之CPT1A的DNA表現之測量位準的圖。

【0055】 圖72是顯示使用取自膀胱癌患者的尿液之CPT1A的DNA表現之測量位準的圖。

【0056】 圖73是顯示使用取自正常人的尿液之CPT1A的DNA表現之測量

位準的圖。

【0057】 圖74是顯示來自未經IFN-γ處理之PD-L1陽性癌細胞株或PD-L1陰性癌細胞株的cfDNA之PD-L1的DNA表現之測量位準的圖，以及測量PD-L1是否被本發明的一個實施例的方法偵測到的結果。

【0058】 圖75是顯示來自未經IFN-γ處理之PD-L1陽性癌細胞株或PD-L1陰性癌細胞株的cfDNA之IFNG (IFN-γ)的DNA表現之測量位準的圖。

【0059】 圖76是顯示來自未經IFN-γ處理之PD-L1陽性癌細胞株或PD-L1陰性癌細胞株的cfDNA之IFNR1 (IFN-γ受體)的DNA表現之測量位準的圖。

【0060】 圖77至79是顯示來自經IFN-γ處理之PD-L1陽性癌細胞株或PD-L1陰性癌細胞株的cfDNA之PD-L1、IFNG和IFNR1的DNA表現之測量位準的圖。

【0061】 圖80是顯示來自取決於存在或不存在IFN-γ處理之PD-L1陽性癌細胞株或PD-L1陰性癌細胞株的cfDNA之PD-L1的DNA表現之測量位準的圖。

【0062】 圖81是顯示來自取決於存在或不存在IFN-γ處理之PD-L1陽性癌細胞株或PD-L1陰性癌細胞株的cfDNA之IFN-γ的DNA表現之測量位準的圖。

【0063】 圖82是顯示來自取決於存在或不存在IFN-γ處理之PD-L1陽性癌細胞株或PD-L1陰性癌細胞株的cfDNA之PD-L1的DNA表現測量位準的圖。

【0064】 圖83是顯示來自取決於存在或不存在IFN-γ處理之PD-L1陽性癌細胞株或PD-L1陰性癌細胞株的cfDNA之PD-L1的DNA表現之測量位準的圖。

【0065】 圖84是顯示本發明的偵測步驟的示意圖。

【0066】 圖84a顯示用於在獲得來自病患體液的cfDNA之後，使用具有聚乙烯亞胺(PEI)結合至奈米線表面之奈米線(PEI/Ppy NWs)經由與探針和HRP/鏈黴抗生物素蛋白-奈米顆粒(HRP/st-帶標NP)的反應在約60分鐘內分析基因突變之方法的示意圖。

【0067】 圖84b是顯示使用奈米線、探針和HRP/鏈黴抗生物素蛋白奈米顆

粒偵測不穩定cfDNA之方法的示意圖。

【0068】 圖84c是顯示使用不包含磁性奈米顆粒之奈米線經由旋轉管柱(spin column)偵測基因突變的過程的圖。在本發明的一個實施例中，可進一步包括經裂解緩衝液處理之步驟。

【0069】 圖84d顯示用於在例如血液、腦脊髓液或肋膜積液之樣本中偵測不穩定cfDNA之方法的時序流程圖。

【0070】 圖84e顯示用於在例如尿液之樣本中偵測不穩定cfDNA之方法的時序流程圖。

【0071】 圖84f是顯示根據取自血液的cfDNA狀態之若干變性條件的差異的示意圖。

【0072】 圖84g是顯示根據取自尿液、唾液與痰的cfDNA狀態之若干變性條件的差異的示意圖。

【0073】 圖85是顯示使用不包含磁性奈米顆粒之奈米線經由旋轉管柱單離cfDNA的圖。上方照片是離心前的旋轉管柱的SEM影像，下方照片是離心後已單離出cfDNA的旋轉管柱的SEM影像。

【0074】 圖86是顯示使用注射針取自肺癌患者的血液之癌症相關生物標記，例如AKL融合與PIK3CA的DNA表現之測量位準的圖。

【0075】 圖87是顯示使用採血針取自肺癌患者的血液之癌症相關生物標記，例如AKL融合與PIK3CA的DNA表現之測量位準的圖。

【0076】 圖88是顯示使用注射針取自正常人的血液之癌症相關生物標記，例如AKL融合的DNA表現之測量位準的圖。

【0077】 圖89是顯示使用採血針取自正常人的血液之癌症相關生物標記，例如AKL融合DNA表現之測量位準的圖。

【0078】 圖90是經由RT-PCR確認來自EML4-ALK變體3a/b陽性細胞

(H2228)與EML4-ALK陰性細胞(A549、H1993、PC9、RT4)癌細胞株的cfDNA之EML4-ALK表現位準的圖。

【0079】 圖91是經由西方墨點法確認來自EML4-ALK變體3a/b陽性細胞(H2228)與EML4-ALK陰性細胞(A549、H1993、PC9、RT4)癌細胞株的cfDNA之EML4-ALK表現位準的圖。

【0080】 圖92是顯示經由RT-PCR與西方墨點法確認來自EML4-ALK變體3a/b陽性細胞(H2228)與EML4-ALK陰性細胞(A549、H1993、PC9、RT4)癌細胞株的cfDNA之EML4-ALK表現位準的結果的圖表。

【0081】 圖93是來自EML4-ALK變體3a/b陽性細胞(H2228)與EML4-ALK陰性細胞(A549、H1993、PC9、RT4)癌細胞株的cfDNA之EML4-ALK融合var.1或EML4-ALK融合var.3的DNA表現之測量位準的圖。

【0082】 圖94是來自EML4-ALK變體3a/b陽性細胞(H2228)與EML4-ALK陰性細胞(A549、H1993、PC9、RT4)癌細胞株的cfDNA之EML4-ALK融合var.1或EML4-ALK融合var.3的DNA表現之測量位準的圖表。

【0083】 圖95是顯示取自小細胞肺癌患者的血液之癌症相關生物標記，例如EML4-ALK融合var.3、KRAS、SYP、NCAM1與NKX2-1的DNA表現之測量位準的圖。結果是，發現EML4-ALK融合在癌症組織和血液中的ctDNA中是相同的，ctDNA的結果是，發現EML4-ALK融合是var.3而非var.1，指出作為ALK TKI的截剋瘤(Crizotinib)回應不佳。

【0084】 圖96是顯示取自癌症患者的血液之癌症相關生物標記，例如EML4-ALK融合var.1的DNA表現之測量位準的圖。結果是，發現EML4-ALK融合在癌症組織和血液中的ctDNA中是相同的，ctDNA的結果是，發現EML4-ALK融合是var.1而非var.3，指出作為ALK TKI的截剋瘤反應良好且獲得部分回應(PR)之患者回應。

【0085】圖97是顯示取自癌症患者的血液之癌症相關生物標記，例如EML4-ALK融合var.3的DNA表現之測量位準的圖。結果是，發現EML4-ALK融合與癌症組織和血液中的ctDNA是相同的，ctDNA的結果是，發現EML4-ALK融合是var.3而非var.1，指出作為ALK TKI的截剋瘤將回應不佳，於是從一開始就開立安立適(alectinib)以等待患者的回應。

【0086】圖98是顯示取自癌症患者的血液之癌症相關生物標記，例如EML4-ALK融合var.3、BRAFV800E與TP53的DNA表現之測量位準的圖。結果是，發現EML4-ALK融合在癌症組織和血液中的ctDNA中是相同的，ctDNA的結果是，發現EML4-ALK融合是var.3而非var.1，指出作為ALK TKI的截剋瘤回應不佳(PD)。

【0087】圖99是顯示取自癌症患者的血液之癌症相關生物標記，例如EML4-ALK融合var.1的DNA表現之測量位準的圖。結果是，發現EML4-ALK融合在癌症組織和血液中的ctDNA中是相同的，ctDNA的結果是，發現EML4-ALK融合是var.1而非var.3，指出作為ALK TKI的截剋瘤反應良好且獲得部分回應(PR)之患者回應。

【0088】圖100是顯示取自癌症患者的血液之癌症相關生物標記，例如EML4-ALK融合var.1的DNA表現之測量位準的圖。結果是，發現EML4-ALK融合在癌症組織和血液中的ctDNA中是相同的，ctDNA的結果是，發現EML4-ALK融合是var.1而非var.3，指出作為ALK TKI的截剋瘤回應良好且獲得部分回應(PR)之患者回應。

【0089】圖101是經由西方墨點法確認來自各個體外癌細胞株的cfDNA之OGT的蛋白質表現位準的圖。

【0090】圖102是經由RT-PCR確認來自各個體外癌細胞株的cfDNA之OGT的mRNA表現位準的圖。

【0091】 圖103是顯示經由RT-PCR確認來自各個體外癌細胞株的cfDNA之OGT的mRNA表現位準的結果的圖表。

【0092】 圖104是顯示來自各個體外癌細胞株的cfDNA之OGT的DNA表現之測量位準的圖。

【0093】 圖105是顯示來自各個體外癌細胞株的cfDNA之OGT的DNA表現之測量位準的結果的圖表。

【0094】 圖106是顯示經由西方墨點法、RT-PCR與cfDNA偵測確認來自各個體外癌細胞株的OGT表現位準的結果的圖。

【0095】 圖107是在不包含磁性奈米顆粒之奈米線所偵測到來自各個體外細胞株之OGT的cfDNA的照片。

【0096】 圖108是取自正常人、膀胱炎患者和膀胱癌患者的尿液的量化cfDNA的圖表。

【0097】 圖109是分析取自正常人、膀胱炎患者和膀胱癌患者的尿液的cfDNA之OGT的DNA表現位準的圖表。

【0098】 圖110是分析取自正常人、膀胱炎患者和膀胱癌患者的尿液的cfDNA之OGT的DNA表現位準的圖表。

【0099】 圖111至113是分析作為盲測而取自幾位癌症患者的尿液的cfDNA之OGT的DNA表現位準的圖。

【0100】 圖114至116是分析取自甲狀腺癌患者組織的cfDNA之BRAF V600E與TERT C250T的DNA表現位準的圖。

【0101】 圖117至121是測量取自小細胞肺癌患者的血液之癌症相關生物標記，例如SYP、CgA、NCAM1與NKX2-1的DNA表現位準的圖。特別是，在韓國癌症中心醫院，圖120的患者被確診患有小細胞肺癌(SCLC)並開立截剋瘤，但經確認不具效果。

【0102】 圖122是使用取自非小細胞肺癌患者的血液測量SYP、CgA、NCAM1與NKX2-1的DNA表現位準的圖。

【0103】 圖123是顯示使用取自抗癌治療之前與之後的肺癌患者的血液之CEA的DNA表現位準以及患者預後的圖。

【0104】 圖124至128是使用取自肺癌患者的血液測量癌症相關生物標記，例如NSE與CEA的DNA表現位準的圖。

【0105】 圖129到133是使用取自正常人的血液測量癌症相關生物標記，例如NSE與CEA的DNA表現位準的圖。

【0106】 圖134是使用取自前列腺癌患者的血液測量癌症相關生物標記，例如PSA、PSMA、PAP與PCA3的DNA表現位準的圖。

【0107】 圖135是使用取自正常人的血液測量癌症相關生物標記，例如PSA、PSMA、PAP與PCA3的DNA表現位準的圖。

【0108】 圖136是使用取自前列腺癌患者與正常人的血液測量TMPRSS2-ERG融合的DNA表現位準的圖。

【0109】 圖137是使用取自甲狀腺癌患者的血液測量CEA、NSE、TG (甲狀腺球蛋白)與CALCA的DNA表現位準的圖。

【0110】 圖138是使用取自正常人的血液測量CEA、NSE、TG (甲狀腺球蛋白)與CALCA的DNA表現位準的圖。

【0111】 圖139是使用取自甲狀腺癌患者與正常人的血液測量BRAF突變(V600E)、TERT啟動子突變(C228T、C250T)的DNA表現位準的圖。

【0112】 圖140是取自膀胱癌患者、血尿患者與正常人的尿液測量OGT、FGFR3、TP53、NMP22與Cyfra21-1的DNA表現位準的圖。

【0113】 圖141是使用取自乳癌患者與正常人的血液測量CA27-29與CEA的DNA表現位準的圖。

【0114】 圖142是使用取自大腸直腸癌患者與正常人的血液測量CEA與CA19-9的DNA表現位準的圖。

【0115】 圖143和圖144是使用取自膽管癌患者與正常人的血液測量CA19-9、CEA與CA123的DNA表現位準的圖。

【0116】 圖145是使用取自胃癌患者與正常人的血液測量CEA、CA19-9、CGB與Cyfra21-1的DNA表現位準的圖。

【0117】 圖146是使用取自卵巢癌患者與正常人的血液測量CA125與CEA的DNA表現位準的圖。

【0118】 圖147是使用取自胰臟癌患者的血液測量CEA、CA19-9與CA125的DNA表現位準的圖。

【0119】 圖148是是使用取自正常人的血液測量CEA、CA19-9與CA125的DNA表現位準的圖。

【0120】 圖149和圖150是藉由使用取自正常人的血液測量癌症相關生物標記的DNA表現位準來早期診斷的結果(PC：陽性對照組，PC是用於確認早期癌症診斷的實驗是否準確地進行的工具而與早期癌症診斷的結果無關)。

【0121】 圖151和圖152是根據本發明的一個實施例中使用的癌症類型來組織生物標記的圖。

【0122】 圖153顯示了經由吸光度確認存在於HPV陽性子宮頸癌患者(HPV16 (+)與HPV18 (+))和HPV陰性健康對照組(HPV-)的尿液中的cfDNA與對HPV 18或HPV 16具有特異性之探針存在或不存在結合的結果的圖。

【0123】 圖154顯示了使單離自子宮頸癌患者的尿液的cfDNA與對HPV 16、EGFR19缺失、HPV 18及EGFR 21 L858R具有特異性之探針依序地反應之後，確認cfDNA與各探針存在或不存在結合的結果的圖。

【0124】 圖155是使用取自151位肺癌患者的血漿的cfDNA分析肺癌患者的

基因突變的表格。

【0125】 圖156顯示了確認肺癌患者的基因突變的結果，藉由從無EGFR突變(野生型)患者、具有EGFR外顯子19缺失的患者及具有EGFR外顯子21 L858R的肺癌患者的血漿獲取cfDNA，使其與對EGFR外顯子19 Del具有特異性之探針混合，然後分析UV光譜的吸光度(ΔOD，500 nm至650 nm)的值。

【0126】 圖157顯示了從具有EGFR外顯子19缺失的肺癌患者的血漿獲取cfDNA，使其與對EGFR外顯子19 Del具有特異性之探針混合，然後分析基因突變的特異性與敏感性。

【0127】 圖158顯示了確認肺癌患者的基因突變的結果，藉由從無EGFR突變(野生型)患者、具有EGFR外顯子19缺失的患者及具有EGFR外顯子21 L858R的肺癌患者的血漿獲取cfDNA，添加對EGFR外顯子21 L858R具有特異性之探針，然後分析UV光譜的吸光度(ΔOD，500 nm至650 nm)的值。

【0128】 圖159顯示了從具有EGFR外顯子21 L858R的肺癌患者的血漿獲取cfDNA，添加對EGFR外顯子21 L858R具有特異性之探針，然後分析患者基因突變的特異性與敏感性。

【0129】 圖160顯示EGFR外顯子19缺失的CP和DP的序列。在此研究中，使用CP_1和DP分析肺癌患者的cfDNA基因突變。在此情況下，CP係設計成互補地結合至含有或毗鄰突變部分之序列的探針，DP係設計成互補地結合至與突變序列隔開之一部分的探針。

【0130】 圖161顯示EGFR外顯子20 T790M的CP和DP的序列。在此研究中，使用CP2和DP分析肺癌患者的cfDNA基因突變。

【0131】 圖162顯示EGFR外顯子21 L858R的CP和DP的序列。在此研究中，使用CP2和DP分析肺癌患者的cfDNA基因突變。

【0132】 圖163顯示了在使取自具有EGFR外顯子19缺失與EGFR外顯子20

T790M基因突變之肺癌患者的血漿的cfDNA和對EGFR外顯子19缺失(Del19)、EGFR外顯子20 T790M與EGFR外顯子21 L858R具有特異性之探針反應，然後添加HRP/鏈黴抗生物素蛋白奈米顆粒(包括大量HRP)時，確認cfDNA是否藉由顏色變化與UV吸光度被偵測到的結果。

【0133】 圖164顯示了在使取自與圖163中相同之具有EGFR外顯子19缺失與EGFR外顯子20 T790M基因突變之肺癌患者的血漿的cfDNA和對EGFR外顯子19缺失(Del19)、EGFR外顯子20 T790M與EGFR外顯子21 L858R具有特異性之探針反應，然後添加HRP/鏈黴抗生物素蛋白複合物(HRP與鏈黴抗生物素蛋白以1:1結合的複合物)時，確認cfDNA是否藉由顏色變化與UV吸光度被偵測到的結果。確認了相較於HRP/鏈黴抗生物素蛋白奈米顆粒，雜訊是在HRP/鏈黴抗生物素蛋白複合物的情況下生成的。

【0134】 圖165顯示了經由分析從具有EGFR外顯子19缺失與EGFR外顯子20 T790M基因突變之5位肺癌患者的血漿提取cfDNA，然後和對EGFR外顯子19 Del、EGFR外顯子20 T790M與EGFR外顯子21 L858R具有特異性之探針與HRP/鏈黴抗生物素蛋白奈米顆粒(HRP/st-帶標NPs)反應的結果以及使和對EGFR外顯子19 Del、EGFR外顯子20 T790M與EGFR外顯子21 L858R具有特異性之探針與HRP/鏈黴抗生物素蛋白複合物(HRP與鏈黴抗生物素蛋白以1:1結合)反應的結果，確認並比對基因型與癌症組織之一致性的結果。

【0135】 圖166顯示藉由UV吸光度確認了，當一次混合對EGFR外顯子19缺失(19 Del)、EGFR外顯子20 T790M、EGFR外顯子21 L858R與EGFR外顯子L861Q具有特異性之探針與HRP/st-帶標NP以偵測取自具有EGFR外顯子20 T790M與EGFR外顯子21 L861Q基因突變之肺癌患者血漿的cfDNA的基因突變時，以癌症組織的相同方式僅在EGFR外顯子20 T790M與EGFR外顯子21 L861Q觀察到基因突變的結果。

【0136】圖167顯示確認了，當一次混合對ALK-EML4融合與ALK點突變(T1151、L1152P、L1152R、C1156Y、I1171N/T)具有特異性之探針與HRP/st-帶標NP以偵測取自具有ALK-EML4融合與ALK點突變(I1171N/T)基因突變之肺癌患者血漿的cfDNA的基因突變時，以癌症組織的相同方式偵測到ALK-EML4融合與ALK點突變(I1171N/T)基因型的結果。

【0137】圖168顯示確認了，當一次混合對BRAF V600E具有特異性之探針與HRP/st-帶標NP以偵測取自具有BRAF V600E基因突變之甲狀腺癌患者血漿的cfDNA的基因突變時，以患者基因型的相同方式偵測到BRAF V600E基因突變的結果。

【0138】圖169顯示了在使收集自正常人的血液之樣本在各種溫度條件下變性之後，根據若干處理條件偵測不穩定cfDNA的結果。

【0139】圖170顯示了在使收集自患者的血液之樣本在各種溫度條件下變性之後，根據若干處理條件偵測不穩定cfDNA的結果。

【0140】圖171顯示了在使取自突變細胞株的fDNA在各種溫度條件下變性之後，根據若干處理條件偵測不穩定cfDNA的結果。

【0141】圖172顯示了在37 °C下以DNase處理取自突變細胞株的fDNA持續30分鐘之後，根據若干處理條件偵測不穩定cfDNA的結果。

【0142】圖173顯示了在37 °C下以DNase處理取自突變細胞株的fDNA持續60分鐘之後，根據若干處理條件偵測不穩定cfDNA的結果。

【0143】圖174顯示了在37 °C下以DNase處理取自突變細胞株的fDNA持續120分鐘之後，根據若干處理條件偵測不穩定cfDNA的結果。

【0144】圖175顯示了在24 °C下以1 μL或2 μL的DNase處理120分鐘以根據DNase活性確認不穩定cfDNA與穩定cfDNA之間差異的結果。

【0145】圖176顯示了在3 °C下以1 μL或2 μL的DNase處理120分鐘以根據

DNase活性確認不穩定cfDNA與穩定cfDNA之間差異的結果。

【0146】圖177顯示了作為本發明之範例在使用肺癌患者血漿中的cfDNA偵測EML4-ALK融合基因時的截止值的實施例。

【實施方式】

<術語定義>

【0147】如本案所用，術語「游離DNA」亦稱作cfDNA。此外，cfDNA可為循環腫瘤DNA(ctDNA)，其係由於腫瘤細胞而可在源自癌症病患的例如尿液、腦脊髓液、血漿、血液或體液之生物樣本中找到的癌細胞衍生之DNA。此外，cfDNA可存在於生物樣本中，例如尿液、腦脊髓液、肋膜積液、腹水、血漿、血液、唾液、痰或體液。在此情況下，cfDNA可具有80 bp至10 kbp、100 bp至1 kbp、120 bp至500 bp之尺寸。此外，cfDNA可具有150 bp至200 bp之尺寸，通常可具有165 bp至170 bp之尺寸。此外，cfDNA可包括約80 bp或更少的小型cfDNA。

【0148】如本案所用，術語「不穩定cfDNA」意指相較於「穩定cfDNA」之就熱力學而言係不穩定的cfDNA。換句話說，不穩定cfDNA可在比起穩定cfDNA變性之條件係較不嚴格的條件下變性。為何生成不穩定cfDNA的原因是，不穩定cfDNA具有不穩定的雙螺旋結構。具體而言，衍生自癌症細胞中過度表現之基因的cfDNA可為不穩定cfDNA的一個例子。

【0149】如本案所用，術語「具有不穩定雙螺旋結構的cfDNA」的特徵在於，其具有比起具有穩定雙螺旋結構之cfDNA所具者較低之Tm值，或其在具有穩定雙螺旋結構之cfDNA不變性的條件下變性。Tm是指熔化溫度且意指50%的雙股DNA轉換成單股DNA的溫度。Tm值係與DNA的長度成比例，並可取決於核苷酸序列而變動。然而，由於在基因組DNA中，大量核苷酸是藉由氫鍵結合，所以應在92 °C至95 °C下加熱，持續5分鐘或更久，或在98 °C下加熱，持續2分鐘或更久。此外，在低於90 °C的溫度下，基因組DNA不容易變性。在此情況下，假

設具有穩定雙螺旋結構的cfDNA具有約170 bp的平均核苷酸，其可具有類似於基因組DNA所具有之Tm值。

【0150】 然而，比起具有穩定雙螺旋結構的cfDNA之Tm值，「具有不穩定雙螺旋結構的cfDNA」具有較低之Tm值。因此，當具有穩定雙螺旋結構的cfDNA在選自由下列組成之群組的任一條件下變性：i)在周遭溫度下靜置約1分鐘至約120分鐘的條件；ii)在90 °C至95 °C下加熱約1秒至約3分鐘的條件；iii)在75 °C至90 °C下加熱約1秒至約5分鐘的條件；iv)在60 °C至75 °C下加熱約30秒至約60分鐘的條件；v)在25 °C至40 °C下加熱約10分鐘至約120分鐘的條件；vi)以蛋白酶處理約10秒至約30分鐘的條件；vii)以DNase處理約10秒至約30分鐘的條件；及viii)以化學物質(例如氫氧化鈉、DMSO、表面活性劑等)處理的條件，且隨後經歷與具有互補於cfDNA之部分序列的一序列之15聚體至30聚體探針之結合反應時，該具有穩定雙螺旋結構的cfDNA不與上述探針結合。在此情況下，「周遭溫度」意指室溫，可為約18 °C至約25 °C。另外，在上述條件以外，還可包括在約40 °C至約65 °C下加熱約5分鐘至約80分鐘的條件。

【0151】 然而，當以上述i)至viii)條件中之任一條件處理具有不穩定雙螺旋結構之cfDNA，且隨後進行與15聚體至30聚體探針之結合反應時，已確認了該cfDNA與以上探針結合。在此情況下，上述探針可為約15聚體至約30聚體或約20聚體至約25聚體探針，且可為約21聚體、約22聚體、約23聚體、或約24聚體探針。

【0152】 在此情況下，具有不穩定雙螺旋結構的cfDNA可為循環腫瘤DNA(ctDNA)。

【0153】 如本案所用，術語「探針」意指用於偵測目標cfDNA的DNA或RNA。探針可具有設計成能夠互補地結合至不穩定cfDNA的序列。如本案所用，術語「具有互補於cfDNA之序列的探針」意指具有能夠互補地結合至期望偵測到且存在於像是血漿之流體樣本中之所欲雙螺旋結構的cfDNA之核酸序列的探

針。

【0154】 在此情況下，探針可以兩種方式來構建。一種可為設計成能夠結合至基因之受損區域的第一探針(下文稱作CP)，另一種可為設計成能夠結合至受損區域周邊的第二探針(下文稱作DP)。DP可設計成互補地結合至位於遠離目標DNA序列或出現損傷之區域約10 bp至約100 bp、約20 bp至約50 bp的序列。

【0155】 如本案所用，術語「互補結合」意指探針能結合至目標cfDNA並在適當的雜交條件下形成雙股體(duplex)，而且該探針具有至少約75%、至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%或至少約100%互補於cfDNA目標序列的序列。

【0156】 「雜交條件」可由熟習此藝者基於例如探針的長度、探針的互補性以及雜交緩衝液中的鹽濃度(即，離子強度)而憑經驗決定。一般而言，嚴苛雜交條件是多核苷酸可優先結合至其互補序列，且亦能以相對於目標上的任何其他區域之較高的親和力來結合的那些條件。用於與具有20個鹼基的其多核苷酸序列的互補序列雜交的例示性嚴苛條件可為約50% G+C含量、50 mM鹽(Na+)和60 °C的退火溫度。在較長序列的情況下，雜交可在更高的溫度下進行。一般而言，嚴苛條件是退火在低於該多核苷酸的熔化溫度約5 °C下執行的條件。「熔化溫度」是互補於目標多核苷酸的多核苷酸中之50%在給定離子強度、pH與多核苷酸濃度下互補地結合的溫度。

【0157】 在本說明書中，已確認了即使當第一探針和第二探針係同時使用或第一探針或第二探針係分別使用，也可有效地偵測到受損cfDNA。此外，探針可為結合有例如生物素之材料的形式，俾以與標記結合。或者，探針可直接結合至標記或經由聯接物結合。在此情況下，標記可為奈米顆粒、螢光染料、螢光蛋白或酶。此外，探針可與標記同時添加，也可依序添加。

【0158】 在本發明的一個實施例中，能夠互補地結合至目標cfDNA的探針

可互補地結合至包含對下列癌細胞具有特異性之序列的區域。例如，在對卵巢癌或乳癌具有特異性之序列的情況下，其可為存在於BRCA1外顯子7、BRCA1外顯子10、BRCA1外顯子11、BRCA1外顯子15中的SNP。此外，在對胃癌具有特異性之序列的情況下，其可為存在於TP53中的SNP，而在對大腸直腸癌具有特異性之序列的情況下，其可為存在於MSH2中的SNP。在對肺癌具有特異性之序列的情況下，其可為存在於EGFR中的SNP。在對肝癌具有特異性之序列的情況下，其可為存在於FGFR3中的SNP。

【0159】衍生自癌細胞且對癌細胞具有特異性的生物標記基因係熟習此藝者已知的。例如，可引述下列文件：Circulating Cell-Free DNA in Plasma/Serum of Lung Cancer Patients as a Potential Screening and Prognostic Tool, Pathak et al, Clinical Chemistry October 2006 vol. 52 no. 10 1833-1842; Cell-free Tumor DNA in Blood Plasma As a Marker for Circulating Tumor Cells in Prostate Cancer, Schwarzenbach et al, Clin Cancer Res Feb. 1, 2009 15; 1032; Cell-free DNA: measurement in various carcinomas and establishment of normal reference range, Wua et al, Clinica Chimica Acta, Volume 321, Issues 1-2, July 2002, Pages 77-87; Detection of Circulating Tumour DNA in the Blood (Plasma/Serum) of Cancer Patients, Anker et al, Cancer and Metastasis Reviews 1999, Volume 18, Issue 1, pp 65-73; Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients, Schwarzenbach et al, Nature Reviews Cancer 11, 426-437 (June 2011); Circulating Tumor-Specific DNA: A Marker for Monitoring Efficacy of Adjuvant Therapy in Cancer Patients, Fiegl et al, Cancer Res Feb. 15, 2005 65; 1141。

【0160】在本發明的一個實施例中，能夠互補地結合至目標cfDNA的探針可互補地結合至在下列癌細胞中過度表現的區域。是以，在癌細胞中過度表現的區域可為癌細胞的生物標記。癌細胞的生物標記可為圖151和圖152所示的基因，

但不限於此。此外，在本說明書通篇中，特定腫瘤/癌細胞的各種生物標記基因以及互補地結合至生物標記基因的例示性探針係藉由範例來說明。此外，探針可進一步包含生物素或基於抗生物素蛋白之蛋白質。具體而言，標記可進一步包含選自由下列組成之群組中之任一者：抗生物素蛋白、鏈黴抗生物素蛋白、或其之組合。較佳地，探針可為結合有生物素的形式。

【0161】 如本案所用，術語「分離的生物樣本」意指分離自人體的尿液、唾液、腦脊髓液、肋膜積液、腹水、血漿、血液、痰或體液的樣本。分離的生物樣本可為分離自人體的液體樣本。在此情況下，血漿可取自血液。

【0162】 如本案所用，術語「帶正電材料」是帶正電的材料，且可以奈米顆粒、奈米線、網狀物或過濾器的形式來使用，但不限於此。「帶正電材料」的一個實施例可為具有帶正電表面之奈米線或膜。奈米線或膜可使用導電聚合物來製造。導電聚合物可為選自由下列組成之群組中之任一者：聚(乙炔)、聚(吡咯)、聚(噻吩)、聚(對苯)、聚(3,4-乙烯二氧基噻吩)、聚(苯硫醚)、聚(對苯伸乙烯)、及聚苯胺。儘管長度和直徑可取決於製造方法來適當調整，但就奈米線而言，直徑可選自約50 nm至約500 nm、約100 nm至約500 nm、約100 nm至約400 nm、約150 nm至約350 nm、約200 nm至約400 nm或約100 nm至約300 nm之範圍，而長度可選自數μm至約100 μm、約10 μm至約100 μm、約15 μm至約50 μm、約15 μm至約40 μm或約15 μm至約30 μm之範圍。

【0163】 在一個實施例中，其可為具有約200 nm之直徑和約18 μm之長度的奈米線。此外，奈米線可製造成包括生物素的形式。

【0164】 奈米線或膜的表面可藉由陽離子聚合物來改質。陽離子聚合物的種類不受限制。陽離子聚合物的一個實施例可為聚乙烯亞胺(PEI)或聚離胺酸(PLL)。此外，其可為陽離子分枝聚合物聚乙烯亞胺。藉由此類陽離子聚合物改質的奈米線或膜可在其表面上具有正電荷。為了捕獲cfDNA，奈米線或膜的表面

電荷可為自約20 mV至約80 mV、自約30 mV至約60 mV、及自約35 mV至約50 mV。此外，表面電荷可為約36 mV、約37 mV、約38 mV、約39 mV、約40 mV、約41 mV、約42 mV、約43 mV或約44 mV。

【0165】在一個實施例中，帶正電奈米線可成功地甚至在低濃度下有效率地捕獲cfDNA。特別是，由於奈米線的特性，例如用於與例如DNA之目標分子結合的大表面積和用於促進與DNA相互作用之經增強的移動性，所以可有效地捕獲cfDNA。

【0166】如本案所用，術語「標記」是用於有效地偵測及/或定量衍生自癌細胞之具有雙螺旋結構的cfDNA的材料，具體而言可為量子點、降解特定受質以造成顏色反應的材料、當以某波長照射時會發光的材料等。具體而言，標記可為螢光蛋白，例如GFP (綠色螢光蛋白)、YFP (黃色螢光蛋白)、RFP (紅色螢光蛋白)、或CFP (青色螢光蛋白)。此外，標記可為產色酶或生物發光酶，例如鹼性磷酸酶(AP)、辣根過氧化酶(HRP)、或乙型半乳糖苷酶(BGAL)。

【0167】產色酶係介導產色反應或藉由與受質反應之發光反應。就HRP而言，可使用ABTS、OPD、AmplexRed、DAB、AEC、TMB、同質香草酸(Homovanillic acid)、流明諾(Luminol)等作為此類受質。就AP而言，可使用BCIP (5-溴-4-氯-3-吲哚基磷酸鹽)/NBT (硝基四唑藍)、pNPP (對硝基苯基磷酸鹽)、Fast Red TR/萘酚AS-MX和CDP-Star (2-氯-5-(4-甲氧基螺[1,2-二氧雜環丁烷-3,2'-(5-氯三環[3.3.1.1^{3,7}]癸])-4-基]-1-苯基磷酸二鈉)等。就BGAL而言，可共同使用選自由X-gal (5-溴-4-氯-3-吲哚基-β-d-半乳哌喃糖苷)或ONPG (鄰硝基苯基-β-半乳糖苷)組成之群組的任何受質。生物發光酶可為衍生自螢火蟲(*Photinus pyralis*)、海腎(*Renilla sp.*)、橈足類(*Metridiia longa*)、弧菌屬(*Vibrio*)細菌或渦鞭藻(dinoflagellate)的螢光素酶。

【0168】標記可進一步包括能夠結合至探針的材料。具體而言，當生物素

結合至探針，標記可進一步包括基於抗生物素蛋白之蛋白質。具體而言，標記可進一步包含選自由下列組成之群組中之任一者：抗生物素蛋白、鏈黴抗生物素蛋白、或其之組合。

【0169】 此外，標記可包括生物素。在此情況下，探針可進一步包括基於抗生物素蛋白之蛋白質。具體而言，標記可進一步包含選自由下列組成之群組中之任一者：抗生物素蛋白、鏈黴抗生物素蛋白、或其之組合。

【0170】 在此類標記的一個實施例中，其可以奈米顆粒的形式使用，其中鏈黴抗生物素蛋白與HRP係結合至由導電聚合物和玻尿酸構成的奈米顆粒。在此情況下，導電聚合物係如上述，較佳地可為聚(吡咯)。在另一個實施例中，其可以奈米顆粒的形式使用，其中鏈黴抗生物素蛋白與螢光蛋白係結合至由導電聚合物和玻尿酸構成的奈米顆粒。HRP奈米顆粒的尺寸可為約20 nm至約150 nm，並可為約30 nm至約120 nm、約40 nm至約100 nm。此外，HRP奈米顆粒的尺寸可為約50 nm、約60 nm、約65 nm、約70 nm、約75 nm、或約80 nm。

【0171】 此外，適用於標記的受質可共同使用以致使標記的顏色反應。在此情況下，受質可與標記同時添加，但可在添加標記之前與之後加入。可藉由已知方法使用標記和受質。在一個實施例中，當HRP用作標記時，可使用ABTS (2,2'-次偶氮基雙[3-乙基苯并噻唑-6-磺酸]-二銨鹽)、OPD (鄰苯二胺二氫氯酸鹽)、AmplexRed、DAB (3,3'-二胺基聯苯胺四氫氯酸鹽)、AEC (3-胺基-9-乙基咔唑)、TMB (3,3',5,5'-四甲基聯苯胺)、同質香草酸、或流明諾作為受質。此外，在一個實施例中，當使用螢光蛋白時，可藉由存在或不存在具有照射特定波長的光之後發出的波長的光來偵測標記而非受質。

【0172】 根據一個實施例，本發明的診斷方法可以高精確度和準確性偵測目標cfDNA，舉例來說，即使當目標cfDNA以極少量被包含在生物樣本中時，也可能有效地偵測到。因此，其可有利地用於偵測早期癌細胞。

【0173】藉由偵測存在或不存在編碼存在於生物樣本中之特定異常細胞/組織，例如特定癌症的生物標記的cfDNA，可確認所談論之癌症的診斷、預後或轉移狀態，亦可預測對習用治療方法的抗性/耐受性。

<前列腺癌>

用於診斷前列腺癌的方法

【0174】本發明之一態樣提供一種用於診斷前列腺癌的方法，其藉由在不擴增之下偵測衍生自來自一樣本的前列腺癌細胞之一基因，其中該方法包含a)將單離自一個體之包含游離DNA (下稱cfDNA)的一生物樣本與一帶正電材料混合的一步驟；b)單離結合有cfDNA之該帶正電材料的一步驟；c)在混合物中依序地或同時地混合具有互補於該cfDNA的一序列之一探針與一標記的一步驟；d)移除未結合至cfDNA之該探針與該標記的一步驟；及e)偵測該標記的一步驟，其中具有互補於cfDNA的一序列之該探針係互補地結合至已知為一前列腺癌生物標記之一基因。在此情況下，已知為前列腺癌生物標記的基因可為編碼前列腺癌中過度表現之蛋白質的基因。

【0175】具體而言，具有互補於cfDNA的一序列之探針係互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*KLK3*、*FOLH1*、*PCA3*、*PDE4D7*、*SFMBT2*、*EFEMP1*、*RETN*、*ACADL*、*AGR2*、*COL1A1*、*FAM13C*、*GPX8*、*GRHL2*、*HNF1A*、*HOXB13*、*KLK2*、*MYBPC1*、*NR0B1*、*PITX2*、*SFRP4*、*SLCO1B3*、*TMEFF2*、*TMPRSS2-ERG*、及其之組合。

【0176】此外，使用單離之生物樣本的目的是偵測存在於該樣本中的cfDNA。因此，樣本中的cfDNA可藉由以各種方式被單離及/或濃縮來使用。在一個實施例中，可使用對核酸具有強親和力的硝化纖維素膜。此外，在一個實施例中，帶正電材料可用於捕獲帶負電之cfDNA。帶正電材料可為奈米顆粒、奈米線、網狀物或帶正電過濾器，但不限於此。在「帶正電材料」的一個實施例中，其可

為帶正電奈米結構或帶正電膜。

【0177】在奈米結構的一個例子中，其可包含陽離子聚合物。陽離子聚合物的種類不受限制。陽離子聚合物的一個實施例可為聚乙烯亞胺(PEI)，而且可為陽離子分枝聚合物聚乙烯亞胺。

【0178】此外，藉由混合標示有基於抗生物素蛋白之蛋白質的奈米線與結合有生物素之PEI的溶液，陽離子分枝聚乙烯亞胺(陽離子分枝PEI)可進一步經由生物素-基於抗生物素蛋白之蛋白質的相互作用來結合至該奈米線。結果是，具有陽離子聚合物聚乙烯亞胺結合至奈米結構表面的奈米結構(PEI/mPpy NW)之奈米顆粒可以高密度和不規則分佈被併入。

【0179】該些奈米線可甚至在低濃度下以高效率成功地捕獲基因組DNA和cfDNA。特別是，由於奈米線的特性，例如用於與例如DNA之目標分子結合的大表面積和用於促進與DNA相互作用之經增強的移動性，所以有可能有效率地且有效地捕獲cfDNA。

【0180】在此情況下，目標cfDNA係指待偵測的期望cfDNA。在本說明書中，cfDNA具有雙股。在此情況下，在cfDNA的一部分中，雙股可為退繞的。此外，cfDNA可衍生自前列腺癌細胞的基因。具體而言，cfDNA可包括在前列腺癌細胞中過度表現的核酸序列。在癌細胞中過度表現的核酸序列係指在特定癌細胞中過度表現的核酸序列，儘管其在正常細胞中具有適當的表現位準。

【0181】具體而言，在癌細胞中過度表現的核酸序列的位準或參考(截止)可為當使用標記測量吸光度(光密度)時，OD值是0.007或更多的情況。更具體地，在癌細胞中過度表現的核酸序列的位準或參考中，藉由使用標記測量吸光度而從敏感性和特異性的最大值判定且隨後劃出接收器操作特性曲線的OD值可用作參考。在此情況下，用於測量吸光度所照射的波長可根據標記來適當地決定。cfDNA可為DNA，其中雙股是退繞的(DNA之退繞)。此外，cfDNA可適當地根據

目的來測定。

【0182】 此外，衍生自前列腺癌細胞之cfDNA的特徵可在於i)具有比起具有衍生自正常細胞的一雙螺旋結構之cfDNA所具者較低之Tm值，或ii)在具有衍生自正常細胞的一雙螺旋結構之該cfDNA不變性之一條件下變性。

【0183】 此外，該cfDNA能夠在下列條件中之任一者與可互補地結合至cfDNA之約15聚體至約30聚體探針結合：i)在周遭溫度下靜置約1分鐘至約120分鐘的條件；ii)在約90 °C至約95 °C下加熱約1秒至約3分鐘的條件；iii)在約75 °C至約90 °C下加熱約1秒至約5分鐘的條件；iv)在約60 °C至約75 °C下加熱約30秒至約30分鐘的條件；v)在約25 °C至約40 °C下加熱約10分鐘至約120分鐘的條件；vi)以蛋白酶處理約1分鐘至約30分鐘的條件；vii)以DNase處理約1分鐘至約30分鐘的條件；及viii)以化學物質(例如氫氧化鈉、DMSO、表面活性劑等)處理的條件。

【0184】 在前列腺癌細胞中過度表現的基因可為選自由下列組成之群組中之任一者：*KLK3* (NCBI基因ID: 354)、*FOLH1* (NCBI基因ID: 2346)、*ACPP* (NCBI基因ID: 55)、*PCA3* (NCBI基因ID: 50652)、*PDE4D7* (NCBI基因ID: 5144)、*SFMBT2* (NCBI基因ID: 57713)、*EFEMP1* (NCBI基因ID: 2202)、*RETN* (NCBI基因ID: 56729)、*ACADL* (NCBI基因ID: 33)、*AGR2* (NCBI基因ID: 10551)、*COL1A1* (NCBI基因ID: 1277)、*FAM13C* (NCBI基因ID: 220965)、*GPX8* (NCBI基因ID: 493869)、*GRHL2* (NCBI基因ID: 79977)、*HNF1A* (NCBI基因ID: 6927)、*HOXB13* (NCBI基因ID: 10481)、*KLK2* (NCBI基因ID: 3817)、*MYBPC1* (NCBI基因ID: 4604)、*NR0B1* (NCBI基因ID: 190)、*PITX2* (NCBI基因ID: 5308)、*SFRP4* (NCBI基因ID: 6424)、*SLCO1B3* (NCBI基因ID: 28234)、*TMEFF2* (NCBI基因ID: 23671)、*CPT1A* (NCBI基因ID: 1374)、*IFNG* (NCBI基因ID: 3458)、*CD274* (NCBI基因ID: 29126)、*FOLR1* (NCBI基因ID: 2348)、*EPCAM* (NCBI基因ID: 4072)、*OGT* (NCBI基因ID: 8473)、*TMPRSS2-ERG*、及其之組合。

【0185】在一個實施例中，特異地存在於前列腺癌的基因可為*KLK3*、*FOLH1*、*PCA3*、*PDE4D7*、*SFMBT2*、*EFEMP1*、*RETN*、*ACADL*、*AGR2*、*COL1A1*、*FAM13C*、*GPX8*、*GRHL2*、*HNF1A*、*HOXB13*、*KLK2*、*MYBPC1*、*NR0B1*、*PITX2*、*SFRP4*、*SLCO1B3*、*TMEFF2*、*TMPRSS2-ERG*基因，另外地，可另外地偵測一個或多個選自由*ACPP*、*CPT1A*、*IFNG*、*CD279*、*CD274*、*ERBB2*、*EGFR*、*FOLR1*與*EPCAM*組成的群組中之另外標記基因，以診斷前列腺癌。該另外標記基因不是對前列腺癌具有特異性的標記基因，但在與特異地存在於前列腺癌中的基因組合使用時，用於診斷前列腺癌之方法的敏感性和特異性可顯著增強。

【0186】如本案所用，術語"*KLK3*"是指編碼胰舒血管素-3 (kallikrein-3)、伽瑪-精漿蛋白(gamma-seminoprotein)或前列腺特異性抗原(PSA)的基因。PSA是在前列腺上皮細胞中合成的蛋白水解酶，在前列腺以外的組織很少表現，因而是用於篩檢前列腺癌的有用腫瘤標記。此外，PSA係有利地用於篩檢前列腺癌以及用於判定手術後的復發。

【0187】如本案所用，術語"*FOLH1*"係指編碼前列腺特異性膜抗原(PSMA)的基因。已知PSMA在前列腺中高度表現，前列腺癌細胞相較於正常前列腺細胞的PSMA表現係增加約8倍至約12倍。PSMA係用作診斷前列腺癌的腫瘤標記。

【0188】如本案所用，術語"*ACPP*"係指編碼前列腺酸性磷酸酶(PAP)的基因。PAP是前列腺所製造的酶。PAP在罹患前列腺癌或前列腺疾病的男性中的表現顯示增加，於是用作前列腺癌或前列腺疾病的指標。

【0189】如本案所用，術語"*PCA3*"係指在人類前列腺組織中以非編碼RNA的形式表現的基因。PCA3僅在人類前列腺組織中表現且在前列腺癌細胞中高度地過度表現。PCA3係用作前列腺癌的腫瘤標記。

【0190】如本案所用，術語「探針」是指用於偵測cfDNA的DNA或RNA。探針可具有能夠互補地結合至cfDNA的特定序列。具有互補於cfDNA的序列的探

針係指具有能夠互補地結合至存在於血漿中欲偵測之所欲雙股cfDNA的核酸序列的探針。在此情況下，探針可為結合有生物素之一者。探針可結合到一結合至生物素結合蛋白之標記。

【0191】如本案所用，術語「標記」是指用於偵測結合至cfDNA之探針的材料。標記可為奈米顆粒、螢光染料、螢光蛋白或酶。具體而言，標記可為選自由量子點、HRP與螢光蛋白組成之群組中之任一者。在一個實施例中，標記可為GFP (綠色螢光蛋白)、BFP(藍色螢光蛋白)、CFP (青色螢光蛋白)、YFP(黃色螢光蛋白)或HRP (辣根過氧化酶)，但不限於此。

【0192】標記可為結合有生物素結合蛋白之一者。生物素結合蛋白可為基於抗生物素蛋白之蛋白質、抗生物素蛋白、鏈黴抗生物素蛋白、或中性抗生物素蛋白(neutravidin)，但可不受限地使用，只要其是可特異地結合至生物素之蛋白質即可。在一個實施例中，標記可為結合有鏈黴抗生物素蛋白之一者。

【0193】如本案所用，術語「抗生物素蛋白」係指在鳥類、爬蟲類和兩棲類的輸卵管中製造的同源四聚體蛋白質，分佈在蛋白中並以高親和力結合至生物素。儘管尚未調查其功能本質，但據估計係用於藉由結合至生物素來抑制細菌的生長，生物素是細菌的生長所必需的。

【0194】如本案所用，術語「鏈黴抗生物素蛋白」是單離自抗生物素鏈黴菌(Streptomyces avidinii)的具有約60 kDa之分子量的四聚體生物素結合蛋白。其與抗生物素蛋白具有極低的同源性，但其結構與抗生物素蛋白極為相似。如同抗生物素蛋白，其具有抗菌活性和對生物素的極高結合能力。另一方面，不同於抗生物素蛋白，其不含有碳水化合物、具有酸性等電點(pI = 5)，並具有比起抗生物素蛋白顯著較低的溶解度。市售的鏈黴抗生物素蛋白，例如Thermo Scientific的Pierce Streptavidin是鏈黴抗生物素蛋白的重組形式，具有約53 kDa的分子量且具有接近中性(PI = 6.8至7.5)的等電點。相較於抗生物素蛋白，具有缺乏糖基化和

低PI的鏈黴抗生物素蛋白具有低位準之非特異性結合(特別是凝集素結合)。鏈黴抗生物素蛋白的該等性質使其被選作用於許多偵測系統的理想試劑。

【0195】 如本案所用，術語「崔特抗生物素蛋白(traptavidin)」係指鏈黴抗生物素蛋白的突變體(變體或突變蛋白)，而且是具有對生物素約10倍較慢的解離速率是且具有增加的機械強度和增進的熱穩定性的蛋白質。此外，崔特抗生物素蛋白特異地結合至生物素。

【0196】 本發明的術語「中性抗生物素蛋白(neutravidin)」也稱作「去糖基化抗生物素蛋白」且是為了避免天然存在的抗生物素蛋白和鏈黴抗生物素蛋白的主要缺點而製備的。如該名稱所示，中性抗生物素蛋白是將抗生物素蛋白去糖基化所製成的。其為具有降低的分子量(約60k Da)並維持相較於抗生物素蛋白之高度的生物素結合能力的蛋白質。抗生物素蛋白的去糖基化係將凝集素之結合減少至偵測不到的位準，並降低等電點(pI = 約6.3)，以有效地消除非特異性結合至抗生物素蛋白的主要原因。離胺酸殘基仍然可用，所以其可容易地衍生化或複合，像是鏈黴抗生物素蛋白。此外，由於其展現出高度的生物素結合能力和低的非特異性結合，其可以各種方式用作理想的生物素結合蛋白。

【0197】 如本案所用，術語「偵測標記的步驟」係指偵測經由生物素-抗生物素蛋白的反應結合至探針的標記的步驟。標記的偵測可藉由顏色變化、UV吸光度變化、存在或不存在生物發光、螢光變化、或電化學變化來測量。具體而言，用於偵測標記的方法可取決於使用的標記來不同地執行。例如，當HRP用作標記時，該標記可藉由觀察經由過氧化氫與受質之間的反應的顏色反應來偵測。此外，當標記是例如GFP的螢光蛋白時，標記的存在或不存在可藉由觀察照射特定波長的光之後所偵測到的光來偵測。此外，當標記是螢光素酶時，該標記的存在可藉由生物冷光儀測量加入例如螢光素之受質之後所展現出的生物發光來偵測。

【0198】 此外，本發明的診斷方法可進一步包含使cfDNA變性的步驟。在此情況下，可進行變性步驟，以選擇性地僅使衍生自前列腺癌的cfDNA變性，而不使正常的雙股cfDNA變性。為此，變性步驟的條件可為在約50 °C至約100 °C下進行約0.1秒至約5分鐘。變性溫度的一個實施例可為約95 °C，變性時間可通常為約0.1秒至約8分鐘。此外，可被變性約1秒、約5秒、約10秒、約30秒、約60秒或約90秒。在一個實施例中，變性cfDNA的步驟可在上述步驟c)前執行。

【0199】 具體而言，該方法可進一步包含在上述步驟c)前，在下列條件中之任一者使結合至帶正電材料之樣本或cfDNA變性的一步驟：i)在周遭溫度下靜置約1分鐘至約10分鐘的條件；ii)在約90 °C至約95 °C下加熱1秒至1分鐘的條件；iii)在約75 °C至約90 °C下加熱約10秒至約3分鐘的條件；iv)在約60 °C至約75 °C下加熱約1分鐘至約30分鐘的條件；v)在約25 °C至約40 °C下加熱約5分鐘至約60分鐘的條件；vi)以蛋白酶處理約1分鐘至約10分鐘的條件；vii)以DNase處理約1分鐘至約10分鐘的條件。此變性步驟並不使衍生自正常細胞的雙股cfDNA變性，而是選擇性地僅使衍生自癌細胞的cfDNA變性，藉此使其更容易與探針結合。變性條件i)至vii)可在獲取樣本之後進行。此外，變性條件i)至vii)可在獲取結合至帶正電材料的cfDNA之後進行。此外，變性條件i)至vii)的溫度、蛋白酶和DNase處理時間可適當地調整，只要其不使穩定cfDNA變性即可。

前列腺癌診斷套組

【0200】 本發明的其他態樣提供了一種用於診斷前列腺癌的診斷套組，包含一結合有生物素的探針，該探針互補地結合至前列腺癌中特異地表現之一基因；一帶正電材料；結合有一基於抗生物素蛋白之蛋白質的一標記；及一手冊。

【0201】 在此情況下，前列腺癌中特異地表現之基因可為選自由下列組成之群組中之任一者或多者：*KLK3*、*FOLH1*、*PCA3*、*PDE4D7*、*SFMBT2*、*EFEMP1*、*RETN*、*ACADL*、*AGR2*、*COL1A1*、*FAM13C*、*GPX8*、*GRHL2*、*HNF1A*、*HOXB13*、

KLK2、*MYBPC1*、*NR0B1*、*PITX2*、*SFRP4*、*SLCO1B3*、*TMEFF2*、*TMPRSS2-ERG*、及其之組合。

【0202】 此外，該手冊可說明該套組係構設成能夠藉由下列流程來診斷前列腺癌：a)使用該套組內含的一帶正電材料來單離cfDNA，該cfDNA係來自單離自一個體之一生物樣本；b)在該單離之cfDNA中依序地或同時地混合該套組內含的一結合有生物素的探針與該套組內含的一標記；c)移除未結合至cfDNA之該探針與該標記；及d)偵測該標記的信號。

【0203】 此外，其可進一步包含一結合有生物素的探針，該探針係互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*ACPP*、*CPT1A*、*IFNG*、*CD274*、*FOLR1*、*EPCAM*、*OGT*、及其之組合。

【0204】 此外，探針、帶正電材料及標記係如上文所述。

前列腺癌診斷裝置

【0205】 本發明的其他態樣提供了一種用於診斷前列腺癌的裝置，其藉由在不擴增之下偵測衍生自來自一樣本的前列腺癌細胞之一基因，其中該裝置包含a)一混合部件，用於將單離自一個體之包含cfDNA的一生物樣本與一帶正電材料混合；b)一獲取部件，用於移除除結合有cfDNA之該帶正電材料外之該樣本；c)一反應部件，用於依序地或同時地將一結合有生物素之能夠互補地結合至前列腺癌中特異地表現之基因的探針；及包含鏈黴抗生物素蛋白與一標記的一奈米顆粒添加至結合有cfDNA之該帶正電材料；d)一偵測部件，用於偵測該標記；及e)一資訊處理部件，用於取決於是否偵測到該標記來判定該樣本中是否存在具有互補於該探針且衍生自前列腺癌的一序列之cfDNA。

【0206】 在此情況下，前列腺癌中特異地表現之基因可為選自由下列組成之群組中之任一者或多者：*KLK3*、*FOLH1*、*PCA3*、*PDE4D7*、*SFMBT2*、*EFEMP1*、*RETN*、*ACADL*、*AGR2*、*COL1A1*、*FAM13C*、*GPX8*、*GRHL2*、*HNF1A*、*HOXB13*、

KLK2、*MYBPC1*、*NR0B1*、*PITX2*、*SFRP4*、*SLCO1B3*、*TMEFF2*、*TMPRSS2-ERG*、及其之組合。

【0207】此外，其可進一步包含一結合有生物素的探針，該探針係互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*ACPP*、*CPT1A*、*IFNG*、*CD274*、*FOLR1*、*EPCAM*、*OGT*、及其之組合。

<肺癌>

用於診斷肺癌的方法

【0208】本發明之一態樣提供一種用於診斷肺癌的方法，其藉由在不擴增之下偵測衍生自來自一樣本的肺癌細胞之一基因，其中該方法包含a)將單離自一個體之包含游離DNA (下稱cfDNA)的一生物樣本與一帶正電材料混合的一步驟；b)單離結合有cfDNA之該帶正電材料的一步驟；c)在混合物中依序地或同時地混合具有互補於該cfDNA的一序列之一探針與一標記的一步驟；d)移除未結合至cfDNA之該探針與該標記的一步驟；及e)偵測該標記的一步驟，其中具有互補於cfDNA的一序列之該探針係互補地結合至已知為一肺癌生物標記之一基因。在此情況下，已知為肺癌生物標記的基因可為編碼肺癌中過度表現之蛋白質的基因。

【0209】具體而言，具有互補於cfDNA的一序列之探針可互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*ENO2*、*SART3*、*KRT19*、*PLAT*、*EGFR*、*ALK*、*ROS1*、*RET*、*ERBB2*、*PI3K*、*S100P*、*MMP11*、*CDCA7*、*S100A2*、*ETV4*、*TOP2A*、*UBE2C*、及其之組合。

【0210】此外，使用單離之生物樣本的目的是偵測存在於該樣本中的cfDNA。因此，樣本中的cfDNA可藉由以各種方式被單離及/或濃縮來使用。在一個實施例中，可使用對核酸具有強親和力的硝化纖維素膜。此外，在一個實施例中，帶正電材料可用於捕獲帶負電之cfDNA。帶正電材料可為奈米顆粒、奈米線、

網狀物或帶正電過濾器，但不限於此。在「帶正電材料」的一個實施例中，其可為帶正電奈米結構或帶正電膜。

【0211】 在奈米結構的一個例子中，其可包含陽離子聚合物。陽離子聚合物的種類不受限制。陽離子聚合物的一個實施例可為聚乙烯亞胺(PEI)，而且可為陽離子分枝聚合物聚乙烯亞胺。

【0212】 此外，藉由混合標示有鏈黴抗生物素蛋白的奈米線與結合有生物素之PEI的溶液，陽離子分枝聚乙烯亞胺(陽離子分枝PEI)可進一步經由生物素-鏈黴抗生物素蛋白的相互作用來結合至該奈米線。結果是，具有陽離子聚合物聚乙烯亞胺結合至奈米結構表面的奈米結構(PEI/mPpy NW)之奈米顆粒可以高密度和不規則分佈被併入。

【0213】 該些奈米線可甚至在低濃度下以高效率成功地捕獲基因組DNA和cfDNA。特別是，由於奈米線的特性，例如用於與例如DNA之目標分子結合的大表面積和用於促進與DNA相互作用之經增強的移動性，所以有可能有效率地且有效地捕獲cfDNA。

【0214】 在此情況下，目標cfDNA係指待偵測的期望cfDNA。在本說明書中，cfDNA具有雙股。在此情況下，在cfDNA的一部分中，雙股可為退繞的。此外，cfDNA可衍生自肺癌細胞的基因。具體而言，cfDNA可包括在肺癌細胞中過度表現的核酸序列。在癌細胞中過度表現的核酸序列係指在特定癌細胞中過度表現的核酸序列，儘管其在正常細胞中具有適當的表現位準。

【0215】 具體而言，在癌細胞中過度表現的核酸序列的位準或參考(截止)可為當使用標記測量吸光度(光密度)時，OD值是0.010或更多的情況。

【0216】 更具體地，在癌細胞中過度表現的核酸序列的位準或參考中，藉由使用標記測量吸光度，OD值為約0.012或約0.015或更多。在此情況下，用於測量吸光度所照射的波長可根據標記來適當地決定。cfDNA可為DNA，其中雙股

是退繞的(DNA之退繞)。此外，cfDNA可適當地根據目的來測定。

【0217】 此外，衍生自肺癌細胞之cfDNA的特徵可在於i)具有比起具有衍生自正常細胞的一雙螺旋結構之cfDNA所具者較低之Tm值，或ii)在具有衍生自正常細胞的一雙螺旋結構之該cfDNA不變性之一條件下變性。

【0218】 此外，該cfDNA能夠在下列條件中之任一者與可互補地結合至cfDNA之約15聚體至約30聚體探針結合：i)在周遭溫度下靜置約1分鐘至約120分鐘的條件；ii)在約90 °C至約95 °C下加熱約1秒至約3分鐘的條件；iii)在約75 °C至約90 °C下加熱約1秒至約5分鐘的條件；iv)在約60 °C至約75 °C下加熱約30秒至約30分鐘的條件；v)在約25 °C至約40 °C下加熱約10分鐘至約120分鐘的條件；vi)以蛋白酶處理約1分鐘至約30分鐘的條件；vii)以DNase處理約1分鐘至約30分鐘的條件。

【0219】 在肺癌細胞中過度表現的基因可為選自由下列組成之群組中之任一者：*ENO2*(NCBI基因ID: 2026)、*SART3*(NCBI基因ID: 9733)、*ACPP*(NCBI基因ID: 55)、*KRT19*(NCBI基因ID: 3880)、*PLAT*(NCBI基因ID: 5327)、*EGFR*(NCBI基因ID: 1956)、*KRAS*(NCBI基因ID: 3845)、*ALK*(NCBI基因ID: 238)、*ROS1*(NCBI基因ID: 6098)、*RET*(NCBI Gene ID: 5979)、*ERBB2*(NCBI基因ID: 2064)、*PI3K*(NCBI基因ID: 5291)、*S100P*(NCBI基因ID: 6286)、*MMP11*(NCBI基因ID: 4320)、*CDCA7*(NCBI基因ID: 83879)、*S100A2*(NCBI基因ID: 6273)、*ETV4*(NCBI基因ID: 2118)、*TOP2A*(NCBI基因ID: 7153)、*UBE2C*(NCBI基因ID: 11065)、*CPT1A*(NCBI基因ID: 1374)、*IFNG*(NCBI基因ID: 3458)、*CD274*(NCBI基因ID: 29126)、*FOLR1*(NCBI基因ID: 2348)、*EPCAM*(NCBI基因ID: 4072)、*OGT* (NCBI基因ID: 8473)、及其之組合。

【0220】 在一個實施例中，特異地存在於肺癌的基因可為*SART3*、*PLAT*、*ALK*、*ROS1*、*PI3K*、*S100P*、*CDCA7*、*S100A2*、*ETV4*基因，另外地，可另外地

偵測一個或多個選自*ENO2*、*ACPP*、*KRT19*、*EGFR*、*KRAS*、*RET*、*ERBB2*、*MMP11*、*TOP2A*、*UBE2C*、*CPT1A*、*IFNG*、*CD279*、*CD274*、*ERBB2*、*EGFR*、*FOLR1*與*EPCAM*組成的群組中之另外標記基因，以診斷肺癌。

【0221】 如本案所用，術語 "*ENO2*"係指編碼已知為伽瑪-烯醇酶或烯醇酶2或NSE (神經元特異性烯醇酶)的基因。NSE係用作小細胞肺癌、神經母細胞瘤及甲狀腺髓樣癌的腫瘤標記。

【0222】 如本案所用，術語"*SART3*"係指編碼鱗狀細胞癌抗原(SCCA)的基因。SCCA係用作腫瘤標記，因其在許多鱗狀細胞癌，例如外陰癌、陰道癌、食道癌、舌癌和咽癌以及子宮頸鱗狀細胞癌的患者血液中展現出陽性。

【0223】 如本案所用，術語"*KRT19*"係指編碼已知為Cyfra 21-1、CK-19 (細胞角質蛋白-19)或K19 (角質蛋白-19)的蛋白質的基因。已知Cyfra 21-1與起源於上皮細胞的癌症，例如肺癌和頭頸癌相關。此外，據報導，罹患肺炎或肺病的患者相較於正常人的Cyfra 21-1的血液位準是增加的，Cyfra 21-1係用作腫瘤指標。

【0224】 如本案所用，術語"*PLAT*"係指編碼TPA(組織型血纖維蛋白溶酶原活化因子)的基因，其係參與血液凝塊破壞的蛋白質。

【0225】 如本案所用，術語「探針」是指用於偵測cfDNA的DNA或RNA。探針可具有能夠互補地結合至cfDNA的特定序列。具有互補於cfDNA的序列的探針係指具有能夠互補地結合至存在於血漿中欲偵測之所欲雙股cfDNA的核酸序列的探針。在此情況下，探針可為結合有生物素之一者。探針可結合到一結合至生物素結合蛋白之標記。

【0226】 如本案所用，術語「標記」是指用於偵測結合至cfDNA之探針的材料。標記可為奈米顆粒、螢光染料、螢光蛋白或酶。具體而言，標記可為選自由量子點、HRP與螢光蛋白組成之群組中之任一者。在一個實施例中，標記可為GFP (綠色螢光蛋白)、BFP(藍色螢光蛋白)、CFP (青色螢光蛋白)、YFP(黃色螢光

蛋白)或HRP (辣根過氧化酶)，但不限於此。

【0227】 標記可為結合有生物素結合蛋白之一者。生物素結合蛋白可為基於抗生物素蛋白之蛋白質、抗生物素蛋白、鏈黴抗生物素蛋白、或中性抗生物素蛋白，但可不受限地使用，只要其是可特異地結合至生物素之蛋白質即可。在一個實施例中，標記可為結合有鏈黴抗生物素蛋白之一者。

【0228】 如本案所用，術語「鏈黴抗生物素蛋白」是單離自抗生物素鏈黴菌的具有約60 kDa之分子量的四聚體生物素結合蛋白。其與抗生物素蛋白具有極低的同源性，但其結構與抗生物素蛋白極為相似。如同抗生物素蛋白，其具有抗菌活性和對生物素的極高結合能力。另一方面，不同於抗生物素蛋白，其不含有碳水化合物、具有酸性等電點(pI = 5)，並具有比起抗生物素蛋白顯著較低的溶解度。市售的鏈黴抗生物素蛋白，例如Thermo Scientific的Pierce Streptavidin是鏈黴抗生物素蛋白的重組形式，具有約53 kDa的分子量且具有接近中性(PI = 6.8至7.5)的等電點。相較於抗生物素蛋白，具有缺乏糖基化和低PI的鏈黴抗生物素蛋白具有低位準之非特異性結合(特別是凝集素結合)。鏈黴抗生物素蛋白的該等性質使其被選作用於許多偵測系統的理想試劑。

【0229】 如本案所用，術語「崔特抗生物素蛋白(traptavidin)」係指鏈黴抗生物素蛋白的突變體(變體或突變蛋白)，而且是具有對生物素約10倍較慢的解離速率是且具有增加的機械強度和增進的熱穩定性的蛋白質。此外，崔特抗生物素蛋白特異地結合至生物素。

【0230】 本發明的術語「中性抗生物素蛋白」也稱作「去糖基化抗生物素蛋白」且是為了避免天然存在的抗生物素蛋白和鏈黴抗生物素蛋白的主要缺點而製備的。如該名稱所示，中性抗生物素蛋白是將抗生物素蛋白去糖基化所製成的。其為具有降低的分子量(約60k Da)並維持相較於抗生物素蛋白之高度的生物素結合能力的蛋白質。抗生物素蛋白的去糖基化係將凝集素之結合減少至偵測

不到的位準，並降低等電點(pI = 約6.3)，以有效地消除非特異性結合至抗生物素蛋白的主要原因。離胺酸殘基仍然可用，所以其可容易地衍生化或複合，像是鏈黴抗生物素蛋白。此外，由於其展現出高度的生物素結合能力和低的非特異性結合，其可以各種方式用作理想的生物素結合蛋白。

【0231】 如本案所用，術語「偵測標記的步驟」係指偵測經由生物素-抗生物素蛋白的反應結合至探針的標記的步驟。標記的偵測可藉由顏色變化、UV吸光度變化、存在或不存在生物發光、螢光變化、或電化學變化來測量。具體而言，用於偵測標記的方法可取決於使用的標記來不同地執行。例如，當HRP用作標記時，該標記可藉由觀察經由過氧化氫與受質之間的反應的顏色反應來偵測。此外，當標記是例如GFP的螢光蛋白時，標記的存在或不存在可藉由觀察照射特定波長的光之後所偵測到的光來偵測。此外，當標記是螢光素酶時，該標記的存在可藉由生物冷光儀測量加入例如螢光素之受質之後所展現出的生物發光來偵測。

【0232】 此外，本發明的診斷方法可進一步包含使cfDNA變性的步驟。在此情況下，可進行變性步驟，以選擇性地僅使衍生自肺癌的cfDNA變性，而不使正常的雙股cfDNA變性。為此，變性步驟的條件可為在約50 °C至約100 °C下進行約0.1秒至約5分鐘。變性溫度的一個實施例可為約95 °C，變性時間可通常為約0.1秒至約8分鐘。此外，可被變性約1秒、約5秒、約10秒、約30秒、約60秒或約90秒。在一個實施例中，變性cfDNA的步驟可在上述步驟c)前執行。

【0233】 具體而言，該方法可進一步包含在上述步驟c)前，在下列條件中之任一者使結合至帶正電材料之樣本或cfDNA變性的一步驟：i)在周遭溫度下靜置約1分鐘至約10分鐘的條件；ii)在約90 °C至約95 °C下加熱1秒至1分鐘的條件；iii)在約75 °C至約90 °C下加熱約10秒至約3分鐘的條件；iv)在約60 °C至約75 °C下加熱約1分鐘至約30分鐘的條件；v)在約25 °C至約40 °C下加熱約5分鐘至約60

分鐘的條件；vi)以蛋白酶處理約1分鐘至約10分鐘的條件；vii)以DNase處理約1分鐘至約10分鐘的條件。此變性步驟並不使衍生自正常細胞的雙股cfDNA變性，而是選擇性地僅使衍生自癌細胞的cfDNA變性，藉此使其更容易與探針結合。變性條件i)至vii)可在獲取樣本之後進行。此外，變性條件i)至vii)可在獲取結合至帶正電材料的cfDNA之後進行。此外，變性條件i)至vii)的溫度、蛋白酶和DNase處理時間可適當地調整，只要其不使穩定cfDNA變性即可。

肺癌診斷套組

【0234】本發明的其他態樣提供了一種用於診斷肺癌的診斷套組，包含一結合有生物素的探針，該探針互補地結合至肺癌中特異地表現之一基因；一帶正電材料；結合有一基於抗生物素蛋白之蛋白質的一標記；及一手冊。

【0235】在此情況下，肺癌中特異地表現之基因可選自由下列組成之群組中之任一者或多者：*SART3*、*PLAT*、*ALK*、*ROS1*、*PI3K*、*S100P*、*CDCA7*、*S100A2*、*ETV4*、及其之組合。

【0236】此外，該手冊可說明該套組係構設成能夠藉由下列流程來診斷肺癌：a)使用該套組內含的一帶正電材料來單離cfDNA，該cfDNA係來自單離自一個體之一生物樣本；b)在該單離之cfDNA中依序地或同時地混合該套組內含的一結合有生物素的探針與該套組內含的一標記；c)移除未結合至cfDNA之該探針與該標記；及d)偵測該標記的信號。

【0237】此外，其可進一步包含一結合有生物素的探針，該探針係互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*ENO2*、*ACPP*、*KRT19*、*EGFR*、*KRAS*、*RET*、*ERBB2*、*MMP11*、*TOP2A*、*UBE2C*、*CPT1A*、*IFNG*、*CD279*、*CD274*、*ERBB2*、*EGFR*、*FOLR1*、*EPCAM*、及其之組合。

【0238】此外，探針、帶正電材料及標記係如上文所述。

肺癌診斷裝置

【0239】 本發明的其他態樣提供了一種用於診斷肺癌的裝置，其藉由在不擴增之下偵測衍生自來自一樣本的肺癌細胞之一基因，其中該裝置包含a)一混合部件，用於將單離自一個體之包含cfDNA的一生物樣本與一帶正電材料混合；b)一獲取部件，用於移除除結合有cfDNA之該帶正電材料外之該樣本；c)一反應部件，用於依序地或同時地將一結合有生物素之能夠互補地結合至肺癌中特異地表現之基因的探針；及包含鏈黴抗生物素蛋白與一標記的一奈米顆粒添加至結合有cfDNA之該帶正電材料；d)一偵測部件，用於偵測該標記；及e)一資訊處理部件，用於取決於是否偵測到該標記來判定該樣本中是否存在具有互補於該探針且衍生自肺癌的一序列之cfDNA。

【0240】 在此情況下，肺癌中特異地表現之基因可選自由下列組成之群組中之任一者或多者：*SART3*、*PLAT*、*ALK*、*ROS1*、*PI3K*、*S100P*、*CDCA7*、*S100A2*、*ETV4*、及其之組合。

【0241】 此外，其可進一步包含一結合有生物素的探針，該探針係互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*ENO2*、*ACPP*、*KRT19*、*EGFR*、*KRAS*、*RET*、*ERBB2*、*MMP11*、*TOP2A*、*UBE2C*、*CPT1A*、*IFNG*、*CD279*、*CD274*、*ERBB2*、*EGFR*、*FOLR1*、*EPCAM*、及其之組合。

<甲狀腺癌>

用於診斷甲狀腺癌的方法

【0242】 本發明之一態樣提供一種用於診斷甲狀腺癌的方法，其藉由在不擴增之下偵測衍生自來自一樣本的甲狀腺癌細胞之一基因，其中該方法包含a)將單離自一個體之包含游離DNA (下稱cfDNA)的一生物樣本與一帶正電材料混合的一步驟；b)單離結合有cfDNA之該帶正電材料的一步驟；c)在混合物中依序地或同時地混合具有互補於該cfDNA的一序列之一探針與一標記的一步驟；d)移除未結合至cfDNA之該探針與該標記的一步驟；及e)偵測該標記的一步驟，其中具

有互補於cfDNA的一序列之該探針係互補地結合至已知為一甲狀腺癌生物標記之一基因。在此情況下，已知為甲狀腺癌生物標記的基因可為編碼甲狀腺癌中過度表現之蛋白質的基因。

【0243】 具體而言，具有互補於cfDNA的一序列之探針可互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*TG*、*CALCA*、*APOC1*、*HIG2*、及其之組合。

【0244】 此外，使用單離之生物樣本的目的是偵測存在於該樣本中的cfDNA。因此，樣本中的cfDNA可藉由以各種方式被單離及/或濃縮來使用。在一個實施例中，可使用對核酸具有強親和力的硝化纖維素膜。此外，在一個實施例中，帶正電材料可用於捕獲帶負電之cfDNA。帶正電材料可為奈米顆粒、奈米線、網狀物或帶正電過濾器，但不限於此。在「帶正電材料」的一個實施例中，其可為帶正電奈米結構或帶正電膜。

【0245】 在奈米結構的一個例子中，其可包含陽離子聚合物。陽離子聚合物的種類不受限制。陽離子聚合物的一個實施例可為聚乙烯亞胺(PEI)，而且可為陽離子分枝聚合物聚乙烯亞胺。

【0246】 此外，藉由混合標示有鏈黴抗生物素蛋白之蛋白質的奈米線與結合有生物素之PEI的溶液，陽離子分枝聚乙烯亞胺(陽離子分枝PEI)可進一步經由生物素-鏈黴抗生物素蛋白之蛋白質的相互作用來結合至該奈米線。結果是，具有陽離子聚合物聚乙烯亞胺結合至奈米結構表面的奈米結構(PEI/mPpy NW)之奈米顆粒可以高密度和不規則分佈被併入。

【0247】 該些奈米線可甚至在低濃度下以高效率成功地捕獲基因組DNA和cfDNA。特別是，由於奈米線的特性，例如用於與例如DNA之目標分子結合的大表面積和用於促進與DNA相互作用之經增強的移動性，所以有可能有效率地且有效地捕獲cfDNA。

【0248】 在此情況下，目標cfDNA係指待偵測的期望cfDNA。在本說明書中，cfDNA具有雙股。在此情況下，在cfDNA的一部分中，雙股可為退繞的。此外，cfDNA可衍生自甲狀腺癌細胞的基因。具體而言，cfDNA可包括在甲狀腺癌細胞中過度表現的核酸序列。在癌細胞中過度表現的核酸序列係指在特定癌細胞中過度表現的核酸序列，儘管其在正常細胞中具有適當的表現位準。

【0249】 具體而言，在癌細胞中過度表現的核酸序列的位準或參考(截止)可為當使用標記測量吸光度(光密度)時，OD值是0.010或更多的情況。

【0250】 更具體地，在癌細胞中過度表現的核酸序列的位準或參考中，藉由使用標記測量吸光度，OD值為約0.012或約0.015或更多。在此情況下，用於測量吸光度所照射的波長可根據標記來適當地決定。cfDNA可為DNA，其中雙股是退繞的(DNA之退繞)。此外，cfDNA可適當地根據目的來測定。

【0251】 此外，衍生自甲狀腺癌細胞之cfDNA的特徵可在於i)具有比起具有衍生自正常細胞的一雙螺旋結構之cfDNA所具者較低之Tm值，或ii)在具有衍生自正常細胞的一雙螺旋結構之該cfDNA不變性之一條件下變性。

【0252】 此外，該cfDNA能夠在下列條件中之任一者與可互補地結合至cfDNA之約15聚體至約30聚體探針結合：i)在周遭溫度下靜置約1分鐘至約120分鐘的條件；ii)在約90 °C至約95 °C下加熱約1秒至約3分鐘的條件；iii)在約75 °C至約90 °C下加熱約1秒至約5分鐘的條件；iv)在約60 °C至約75 °C下加熱約30秒至約30分鐘的條件；v)在約25 °C至約40 °C下加熱約10分鐘至約120分鐘的條件；vi)以蛋白酶處理約1分鐘至約30分鐘的條件；vii)以DNase處理約1分鐘至約30分鐘的條件；及viii)以化學物質(例如氫氧化鈉、DMSO、表面活性劑等)處理的條件。

【0253】 在甲狀腺癌細胞中過度表現的基因可為選自由下列組成之群組中之任一者：*ACPP*(NCBI基因ID: 55)、*ENO2*(NCBI基因ID: 2026)、*TG*(NCBI基因ID: 7038)、*CALCA*(NCBI基因ID: 796)、*APOC1*(NCBI基因ID: 341)、*HIG2*(NCBI

基因ID: 29923)、*TYRO3*(NCBI基因ID: 7301)、*CPT1A*(NCBI基因ID: 1374)、*IFNG*(NCBI基因ID: 3458)、*CD274*(NCBI基因ID: 29126)、*FOLR1*(NCBI基因ID: 2348)、*EPCAM*(NCBI基因ID: 4072)、及其之組合。

【0254】 在一個實施例中，特異地存在於甲狀腺癌的基因可為*TG*、*CALCA*、*APOC1*、*HIG2*基因，另外地，可另外地偵測一個或多個選自由*ENO2*、*ACPP*、*TYRO3*、*CPT1A*、*IFNG*、*CD279*、*CD274*、*ERBB2*、*EGFR*、*FOLR1*與*EPCAM*組成的群組中之另外標記基因，以診斷甲狀腺癌。

【0255】 如本案所用，術語"*TG*"係指編碼甲狀腺球蛋白(Tg)的基因。甲狀腺球蛋白僅在人體甲狀腺中生成，當甲狀腺癌發展或轉移時，血液中的甲狀腺球蛋白的位準係增加。血液中的甲狀腺球蛋白的位準係用作甲狀腺癌標記。

【0256】 如本案所用，術語"*CALCA*"係指編碼抑鈣素基因相關肽的基因。

【0257】 如本案所用，術語「探針」是指用於偵測cfDNA的DNA或RNA。探針可具有能夠互補地結合至cfDNA的特定序列。具有互補於cfDNA的序列的探針係指具有能夠互補地結合至存在於血漿中欲偵測之所欲雙股cfDNA的核酸序列的探針。在此情況下，探針可為結合有生物素之一者。探針可結合到一結合至生物素結合蛋白之標記。

【0258】 如本案所用，術語「標記」是指用於偵測結合至cfDNA之探針的材料。標記可為奈米顆粒、螢光染料、螢光蛋白或酶。具體而言，標記可為選自由量子點、HRP與螢光蛋白組成之群組中之任一者。在一個實施例中，標記可為GFP (綠色螢光蛋白)、BFP(藍色螢光蛋白)、CFP (青色螢光蛋白)、YFP(黃色螢光蛋白)或HRP (辣根過氧化酶)，但不限於此。

【0259】 標記可為結合有生物素結合蛋白之一者。生物素結合蛋白可為基於抗生物素蛋白之蛋白質、抗生物素蛋白、鏈黴抗生物素蛋白、或中性抗生物素蛋白(neutravidin)，但可不受限地使用，只要其是可特異地結合至生物素之蛋白

質即可。在一個實施例中，標記可為結合有鏈黴抗生物素蛋白之一者。

【0260】 如本案所用，術語「鏈黴抗生物素蛋白」是單離自抗生物素鏈黴菌的具有約60 kDa之分子量的四聚體生物素結合蛋白。其與抗生物素蛋白具有極低的同源性，但其結構與抗生物素蛋白極為相似。如同抗生物素蛋白，其具有抗菌活性和對生物素的極高結合能力。另一方面，不同於抗生物素蛋白，其不含有碳水化合物、具有酸性等電點(pI = 5)，並具有比起抗生物素蛋白顯著較低的溶解度。市售的鏈黴抗生物素蛋白，例如Thermo Scientific的Pierce Streptavidin是鏈黴抗生物素蛋白的重組形式，具有約53 kDa的分子量且具有接近中性(PI = 6.8至7.5)的等電點。相較於抗生物素蛋白，具有缺乏糖基化和低PI的鏈黴抗生物素蛋白具有低位準之非特異性結合(特別是凝集素結合)。鏈黴抗生物素蛋白的該等性質使其被選作用於許多偵測系統的理想試劑。

【0261】 如本案所用，術語「崔特抗生物素蛋白」係指鏈黴抗生物素蛋白的突變體(變體或突變蛋白)，而且是具有對生物素約10倍較慢的解離速率是且具有增加的機械強度和增進的熱穩定性的蛋白質。此外，崔特抗生物素蛋白特異地結合至生物素。

【0262】 本發明的術語「中性抗生物素蛋白」也稱作「去糖基化抗生物素蛋白」且是為了避免天然存在的抗生物素蛋白和鏈黴抗生物素蛋白的主要缺點而製備的。如該名稱所示，中性抗生物素蛋白是將抗生物素蛋白去糖基化所製成的。其為具有降低的分子量(約60k Da)並維持相較於抗生物素蛋白之高度的生物素結合能力的蛋白質。抗生物素蛋白的去糖基化係將凝集素之結合減少至偵測不到的位準，並降低等電點(pI = 約6.3)，以有效地消除非特異性結合至抗生物素蛋白的主要原因。離胺酸殘基仍然可用，所以其可容易地衍生化或複合，像是鏈黴抗生物素蛋白。此外，由於其展現出高度的生物素結合能力和低的非特異性結合，其可以各種方式用作理想的生物素結合蛋白。

【0263】 如本案所用，術語「偵測標記的步驟」係指偵測經由生物素-抗生物素蛋白的反應結合至探針的標記的步驟。標記的偵測可藉由顏色變化、UV吸光度變化、存在或不存在生物發光、螢光變化、或電化學變化來測量。具體而言，用於偵測標記的方法可取決於使用的標記來不同地執行。例如，當HRP用作標記時，該標記可藉由觀察經由過氧化氫與受質之間的反應的顏色反應來偵測。此外，當標記是例如GFP的螢光蛋白時，標記的存在或不存在可藉由觀察照射特定波長的光之後所偵測到的光來偵測。此外，當標記是螢光素酶時，該標記的存在可藉由生物冷光儀測量加入例如螢光素之受質之後所展現出的生物發光來偵測。

【0264】 此外，本發明的診斷方法可進一步包含使cfDNA變性的步驟。在此情況下，可進行變性步驟，以選擇性地僅使衍生自甲狀腺癌的cfDNA變性，而不使正常的雙股cfDNA變性。為此，變性步驟的條件可為在約50 °C至約100 °C下進行約0.1秒至約5分鐘。變性溫度的一個實施例可為約95 °C，變性時間可通常為約0.1秒至約8分鐘。此外，可被變性約1秒、約5秒、約10秒、約30秒、約60秒或約90秒。在一個實施例中，變性cfDNA的步驟可在上述步驟c)前執行。

【0265】 具體而言，該方法可進一步包含在上述步驟c)前，在下列條件中之任一者使結合至帶正電材料之樣本或cfDNA變性的一步驟：i)在周遭溫度下靜置約1分鐘至約10分鐘的條件；ii)在約90 °C至約95 °C下加熱1秒至1分鐘的條件；iii)在約75 °C至約90 °C下加熱約10秒至約3分鐘的條件；iv)在約60 °C至約75 °C下加熱約1分鐘至約30分鐘的條件；v)在約25 °C至約40 °C下加熱約5分鐘至約60分鐘的條件；vi)以蛋白酶處理約1分鐘至約10分鐘的條件；vii)以DNase處理約1分鐘至約10分鐘的條件。此變性步驟並不使衍生自正常細胞的雙股cfDNA變性，而是選擇性地僅使衍生自癌細胞的cfDNA變性，藉此使其更容易與探針結合。變性條件i)至vii)可在獲取樣本之後進行。此外，變性條件i)至vii)可在獲取結合至帶

正電材料的cfDNA之後進行。此外，變性條件i)至vii)的溫度、蛋白酶和DNase處理時間可適當地調整，只要其不使穩定cfDNA變性即可。

甲狀腺癌診斷套組

【0266】本發明的其他態樣提供了一種用於診斷甲狀腺癌的診斷套組，包含一結合有生物素的探針，該探針互補地結合至甲狀腺癌中特異地表現之一基因；一帶正電材料；結合有一基於抗生物素蛋白之蛋白質的一標記；及一手冊。

【0267】在此情況下，甲狀腺癌中特異地表現之基因可選自由下列組成之群組中之任一者或多者：*TG*、*CALCA*、*APOC1*、*HIG2*、及其之組合。

【0268】此外，該手冊可說明該套組係構設成能夠藉由下列流程來診斷甲狀腺癌：a)使用該套組內含的一帶正電材料來單離cfDNA，該cfDNA係來自單離自一個體之一生物樣本；b)在該單離之cfDNA中依序地或同時地混合該套組內含的一結合有生物素的探針與該套組內含的一標記；c)移除未結合至cfDNA之該探針與該標記；及d)偵測該標記的信號。

【0269】此外，其可進一步包含一結合有生物素的探針，該探針係互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*ENO2*、*ACPP*、*TYRO3*、*CPT1A*、*IFNG*、*CD279*、*CD274*、*ERBB2*、*EGFR*、*FOLR1*、*EPCAM*、及其之組合。

【0270】此外，探針、帶正電材料及標記係如上文所述。

甲狀腺癌診斷裝置

【0271】本發明的其他態樣提供了一種用於診斷甲狀腺癌的裝置，其藉由在不擴增之下偵測衍生自來自一樣本的甲狀腺癌細胞之一基因，其中該裝置包含a)一混合部件，用於將單離自一個體之包含cfDNA的一生物樣本與一帶正電材料混合；b)一獲取部件，用於移除除結合有cfDNA之該帶正電材料外之該樣本；c)一反應部件，用於依序地或同時地將一結合有生物素之能夠互補地結合至甲狀腺癌中特異地表現之基因的探針；及包含鏈黴抗生物素蛋白與一標記的一奈米

顆粒添加至結合有cfDNA之該帶正電材料；d)一偵測部件，用於偵測該標記；及e)一資訊處理部件，用於取決於是否偵測到該標記來判定該樣本中是否存在具有互補於該探針且衍生自甲狀腺癌的一序列之cfDNA。

【0272】 在此情況下，甲狀腺癌中特異地表現之基因可選自由下列組成之群組中之任一者或多者：*TG*、*CALCA*、*APOC1*、*HIG2*、及其之組合。

【0273】 此外，其可進一步包含一結合有生物素的探針，該探針係互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*ENO2*、*ACPP*、*TYRO3*、*CPT1A*、*IFNG*、*CD279*、*CD274*、*ERBB2*、*EGFR*、*FOLR1*、*EPCAM*、及其之組合。

<膀胱癌>

用於診斷膀胱癌的方法

【0274】 本發明之一態樣提供一種用於診斷膀胱癌的方法，其藉由在不擴增之下偵測衍生自來自一樣本的膀胱癌細胞之一基因，其中該方法包含a)將單離自一個體之包含游離DNA (下稱cfDNA)的一生物樣本與一帶正電材料混合的一步驟；b)單離結合有cfDNA之該帶正電材料的一步驟；c)在混合物中依序地或同時地混合具有互補於該cfDNA的一序列之一探針與一標記的一步驟；d)移除未結合至cfDNA之該探針與該標記的一步驟；及e)偵測該標記的一步驟，其中具有互補於cfDNA的一序列之該探針係互補地結合至已知為一膀胱癌生物標記之一基因。在此情況下，已知為膀胱癌生物標記的基因可為編碼膀胱癌中過度表現之蛋白質的基因。

【0275】 具體而言，具有互補於cfDNA的一序列之探針可互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*OGT*、*FGFR3*、*TP53*、*NUMA1*、*COCH*、*CELSR3*、*HMOX1*、*KIF1A*、*MGC17624*、*MTAP*、*PFKFB4*、*S100A8*、*RSPH9*、*FOXM1*、*FANCB*、*FANCC*、*FANCD2*、*RUSC1-AS1*、*CACNA1B*、*IMP-1*、*PDE3A*、*POU3F4*、*SOX3*、*DMC1*、*PLXDC2*、*ZNF312*、*SYCP2L*、*HOXA9*、*ISL1*、*ALDH1A3*、

及其之組合。

【0276】此外，使用單離之生物樣本的目的是偵測存在於該樣本中的cfDNA。因此，樣本中的cfDNA可藉由以各種方式被單離及/或濃縮來使用。在一個實施例中，可使用對核酸具有強親和力的硝化纖維素膜。此外，在一個實施例中，帶正電材料可用於捕獲帶負電之cfDNA。帶正電材料可為奈米顆粒、奈米線、網狀物或帶正電過濾器，但不限於此。在「帶正電材料」的一個實施例中，其可為帶正電奈米結構或帶正電膜。

【0277】在奈米結構的一個例子中，其可包含陽離子聚合物。陽離子聚合物的種類不受限制。陽離子聚合物的一個實施例可為聚乙烯亞胺(PEI)，而且可為陽離子分枝聚合物聚乙烯亞胺。

【0278】此外，藉由混合標示有鏈黴抗生物素蛋白的奈米線與結合有生物素之PEI的溶液，陽離子分枝聚乙烯亞胺(陽離子分枝PEI)可進一步經由生物素-鏈黴抗生物素蛋白的相互作用來結合至該奈米線。結果是，具有陽離子聚合物聚乙烯亞胺結合至奈米結構表面的奈米結構(PEI/mPpy NW)之奈米顆粒可以高密度和不規則分佈被併入。

【0279】該些奈米線可甚至在低濃度下以高效率成功地捕獲基因組DNA和cfDNA。特別是，由於奈米線的特性，例如用於與例如DNA之目標分子結合的大表面積和用於促進與DNA相互作用之經增強的移動性，所以有可能有效率地且有效地捕獲cfDNA。

【0280】在此情況下，目標cfDNA係指待偵測的期望cfDNA。在本說明書中，cfDNA具有雙股。在此情況下，在cfDNA的一部分中，雙股可為退繞的。此外，cfDNA可衍生自膀胱癌細胞的基因。具體而言，cfDNA可包括在膀胱癌細胞中過度表現的核酸序列。在癌細胞中過度表現的核酸序列係指在特定癌細胞中過度表現的核酸序列，儘管其在正常細胞中具有適當的表現位準。

【0281】 具體而言，在癌細胞中過度表現的核酸序列的位準或參考(截止)可為當使用標記測量吸光度(光密度)時，OD值是0.010或更多的情況。更具體地，在癌細胞中過度表現的核酸序列的位準或參考中，藉由使用標記測量吸光度，OD值為約0.012或約0.015或更多。在此情況下，用於測量吸光度所照射的波長可根據標記來適當地決定。cfDNA可為DNA，其中雙股是退繞的(DNA之退繞)。此外，cfDNA可適當地根據目的來測定。

【0282】 此外，衍生自膀胱癌細胞之cfDNA的特徵可在於i)具有比起具有衍生自正常細胞的一雙螺旋結構之cfDNA所具者較低之Tm值，或ii)在具有衍生自正常細胞的一雙螺旋結構之該cfDNA不變性之一條件下變性。

【0283】 此外，該cfDNA能夠在下列條件中之任一者與可互補地結合至cfDNA之約15聚體至約30聚體探針結合：i)在周遭溫度下靜置約1分鐘至約120分鐘的條件；ii)在約90 °C至約95 °C下加熱約1秒至約3分鐘的條件；iii)在約75 °C至約90 °C下加熱約1秒至約5分鐘的條件；iv)在約60 °C至約75 °C下加熱約30秒至約30分鐘的條件；v)在約25 °C至約40 °C下加熱約10分鐘至約120分鐘的條件；vi)以蛋白酶處理約1分鐘至約30分鐘的條件；vii)以DNase處理約1分鐘至約30分鐘的條件；及viii)以化學物質(例如氫氧化鈉、DMSO、表面活性劑等)處理的條件。

【0284】 在膀胱癌細胞中過度表現的基因可為選自由下列組成之群組中之任一者：*OGT*(NCBI基因ID: 8473)、*FGFR3*(NCBI基因ID: 2261)、*TP53*(NCBI基因ID: 7157)、*NUMA1*(NCBI基因ID: 4926)、*KRT19*(NCBI基因ID: 3880)、*COCH*(NCBI基因ID: 1690)、*CELSR3*(NCBI基因ID: 1951)、*HMOX1*(NCBI基因ID: 3162)、*KIF1A*(NCBI基因ID: 547)、*MGC17624*(NCBI基因ID: 404550)、*MTAP*(NCBI基因ID: 4507)、*PFKFB4*(NCBI基因ID: 5210)、*S100A8*(NCBI基因ID: 6279)、*RSPH9*(NCBI基因ID: 221421)、CCNB1(NCBI基因ID: 891)、*FOXM1*(NCBI基因ID: 2305)、*FANCB*(NCBI基因ID: 2187)、*FANCC*(NCBI基因ID: 2176)、*FANCD2*(NCBI

基因ID: 2177)、*RUSC1-AS1*(NCBI基因ID: 284618)、*CACNA1B*(NCBI基因ID: 774)、*IMP-1*(NCBI基因ID: 10642)、*PDE3A*(NCBI基因ID: 5139)、*POU3F4*(NCBI基因ID: 5456)、*SOX3*(NCBI基因ID: 6658)、*DMC1*(NCBI基因ID: 11144)、*PLXDC2*(NCBI基因ID: 84898)、*ZNF312*(NCBI基因ID: 55079)、*SYCP2L*(NCBI基因ID: 221711)、*HOXA9*(NCBI基因ID: 3205)、*ISL1*(NCBI基因ID: 3670)、*ALDH1A3*(NCBI基因ID: 220)、*CPT1A*(NCBI基因ID: 1374)、*IFNG*(NCBI基因ID: 3458)、*CD274*(NCBI基因ID: 29126)、*FOLR1*(NCBI基因ID: 2348)、*EPCAM*(NCBI基因ID: 4072)、及其之組合。

【0285】 在一個實施例中，特異地存在於膀胱癌的基因可為*OGT*、*FGFR3*、*TP53*、*NUMA1*、*COCH*、*CELSR3*、*HMOX1*、*KIF1A*、*MGC17624*、*MTAP*、*PFKFB4*、*S100A8*、*RSPH9*、*FOXM1*、*FANCB*、*FANCC*、*FANCD2*、*RUSC1-AS1*、*CACNA1B*、*IMP-1*、*PDE3A*、*POU3F4*、*SOX3*、*DMC1*、*PLXDC2*、*ZNF312*、*SYCP2L*、*HOXA9*、*ISL1*、*ALDH1A3*基因，另外地，可另外地偵測一個或多個選自由*KRT19*、*CCNB1*、*CPT1A*、*IFNG*、*CD279*、*CD274*、*ERBB2*、*EGFR*、*FOLR1*與*EPCAM*組成的群組中之另外標記基因，以診斷膀胱癌。

【0286】 如本案所用，術語"*OGT*"係指編碼O-GlcNAc轉移酶的基因。

【0287】 如本案所用，術語"*FGFR1*"係指編碼纖維母細胞生長因子受體1的基因。

【0288】 如本案所用，術語"*NUMA1*"係指編碼NMP22 (核基質蛋白-22)的基因。已發現，在包括膀胱癌的某些類型癌症患者的尿液中的NMP22位準高於正常位準，於是NMP22被廣泛用作膀胱癌標記。

【0289】 如本案所用，術語「探針」是指用於偵測cfDNA的DNA或RNA。探針可具有能夠互補地結合至cfDNA的特定序列。具有互補於cfDNA的序列的探針係指具有能夠互補地結合至存在於血漿中欲偵測之所欲雙股cfDNA的核酸序

列的探針。在此情況下，探針可為結合有生物素之一者。探針可結合到一結合至生物素結合蛋白之標記。

【0290】 如本案所用，術語「標記」是指用於偵測結合至cfDNA之探針的材料。標記可為奈米顆粒、螢光染料、螢光蛋白或酶。具體而言，標記可為選自由量子點、HRP與螢光蛋白組成之群組中之任一者。在一個實施例中，標記可為GFP (綠色螢光蛋白)、BFP(藍色螢光蛋白)、CFP (青色螢光蛋白)、YFP(黃色螢光蛋白)或HRP (辣根過氧化酶)，但不限於此。

【0291】 標記可為結合有生物素結合蛋白之一者。生物素結合蛋白可為基於抗生物素蛋白之蛋白質、抗生物素蛋白、鏈黴抗生物素蛋白、或中性抗生物素蛋白(neutravidin)，但可不受限地使用，只要其是可特異地結合至生物素之蛋白質即可。在一個實施例中，標記可為結合有鏈黴抗生物素蛋白之一者。

【0292】 如本案所用，術語「鏈黴抗生物素蛋白」是單離自抗生物素鏈黴菌的具有約60 kDa之分子量的四聚體生物素結合蛋白。其與抗生物素蛋白具有極低的同源性，但其結構與抗生物素蛋白極為相似。如同抗生物素蛋白，其具有抗菌活性和對生物素的極高結合能力。另一方面，不同於抗生物素蛋白，其不含有碳水化合物、具有酸性等電點(pI = 5)，並具有比起抗生物素蛋白顯著較低的溶解度。市售的鏈黴抗生物素蛋白，例如Thermo Scientific的Pierce Streptavidin是鏈黴抗生物素蛋白的重組形式，具有約53 kDa的分子量且具有接近中性(PI = 6.8至7.5)的等電點。相較於抗生物素蛋白，具有缺乏糖基化和低PI的鏈黴抗生物素蛋白具有低位準之非特異性結合(特別是凝集素結合)。鏈黴抗生物素蛋白的該等性質使其被選作用於許多偵測系統的理想試劑。

【0293】 如本案所用，術語「崔特抗生物素蛋白」係指鏈黴抗生物素蛋白的突變體(變體或突變蛋白)，而且是具有對生物素約10倍較慢的解離速率是且具有增加的機械強度和增進的熱穩定性的蛋白質。此外，崔特抗生物素蛋白特異地

結合至生物素。

【0294】本發明的術語「中性抗生物素蛋白」也稱作「去糖基化抗生物素蛋白」且是為了避免天然存在的抗生物素蛋白和鏈黴抗生物素蛋白的主要缺點而製備的。如該名稱所示，中性抗生物素蛋白是將抗生物素蛋白去糖基化所製成的。其為具有降低的分子量(約60k Da)並維持相較於抗生物素蛋白之高度的生物素結合能力的蛋白質。抗生物素蛋白的去糖基化係將凝集素之結合減少至偵測不到的位準，並降低等電點(pI = 約6.3)，以有效地消除非特異性結合至抗生物素蛋白的主要原因。離胺酸殘基仍然可用，所以其可容易地衍生化或複合，像是鏈黴抗生物素蛋白。此外，由於其展現出高度的生物素結合能力和低的非特異性結合，其可以各種方式用作理想的生物素結合蛋白。

【0295】如本案所用，術語「偵測標記的步驟」係指偵測經由生物素-抗生物素蛋白的反應結合至探針的標記的步驟。標記的偵測可藉由顏色變化、UV吸光度變化、存在或不存在生物發光、螢光變化、或電化學變化來測量。具體而言，用於偵測標記的方法可取決於使用的標記來不同地執行。例如，當HRP用作標記時，該標記可藉由觀察經由過氧化氫與受質之間的反應的顏色反應來偵測。此外，當標記是例如GFP的螢光蛋白時，標記的存在或不存在可藉由觀察照射特定波長的光之後所偵測到的光來偵測。此外，當標記是螢光素酶時，該標記的存在可藉由生物冷光儀測量加入例如螢光素之受質之後所展現出的生物發光來偵測。

【0296】此外，本發明的診斷方法可進一步包含使cfDNA變性的步驟。在此情況下，可進行變性步驟，以選擇性地僅使衍生自膀胱癌的cfDNA變性，而不使正常的雙股cfDNA變性。為此，變性步驟的條件可為在約50 °C至約100 °C下進行約0.1秒至約5分鐘。變性溫度的一個實施例可為約95 °C，變性時間可通常為約0.1秒至約8分鐘。此外，可被變性約1秒、約5秒、約10秒、約30秒、約60秒

或約90秒。在一個實施例中，變性cfDNA的步驟可在上述步驟c)前執行。

【0297】 具體而言，該方法可進一步包含在上述步驟c)前，在下列條件中之任一者使結合至帶正電材料之樣本或cfDNA變性的一步驟：i)在周遭溫度下靜置約1分鐘至約10分鐘的條件；ii)在約90 °C至約95 °C下加熱1秒至1分鐘的條件；iii)在約75 °C至約90 °C下加熱約10秒至約3分鐘的條件；iv)在約60 °C至約75 °C下加熱約1分鐘至約30分鐘的條件；v)在約25 °C至約40 °C下加熱約5分鐘至約60分鐘的條件；vi)以蛋白酶處理約1分鐘至約10分鐘的條件；vii)以DNase處理約1分鐘至約10分鐘的條件。此變性步驟並不使衍生自正常細胞的雙股cfDNA變性，而是選擇性地僅使衍生自癌細胞的cfDNA變性，藉此使其更容易與探針結合。變性條件i)至vii)可在獲取樣本之後進行。此外，變性條件i)至vii)可在獲取結合至帶正電材料的cfDNA之後進行。此外，變性條件i)至vii)的溫度、蛋白酶和DNase處理時間可適當地調整，只要其不使穩定cfDNA變性即可。

膀胱癌診斷套組

【0298】 本發明的其他態樣提供了一種用於診斷膀胱癌的診斷套組，包含一結合有生物素的探針，該探針互補地結合至膀胱癌中特異地表現之一基因；一帶正電材料；結合有一基於抗生物素蛋白之蛋白質的一標記；及一手冊。

【0299】 在此情況下，膀胱癌中特異地表現之基因可選自由下列組成之群組中之任一者或多者：*OGT*、*FGFR3*、*TP53*、*NUMA1*、*COCH*、*CELSR3*、*HMOX1*、*KIF1A*、*MGC17624*、*MTAP*、*PFKFB4*、*S100A8*、*RSPH9*、*FOXM1*、*FANCB*、*FANCC*、*FANCD2*、*RUSC1-AS1*、*CACNA1B*、*IMP-1*、*PDE3A*、*POU3F4*、*SOX3*、*DMC1*、*PLXDC2*、*ZNF312*、*SYCP2L*、*HOXA9*、*ISL1*、*ALDH1A3*、及其之組合。

【0300】 此外，該手冊可說明該套組係構設成能夠藉由下列流程來診斷膀胱癌：a)使用該套組內含的一帶正電材料來單離cfDNA，該cfDNA係來自單離自一個體之一生物樣本；b)在該單離之cfDNA中依序地或同時地混合該套組內含的

一結合有生物素的探針與該套組內含的一標記；c)移除未結合至cfDNA之該探針與該標記；及d)偵測該標記的信號。

【0301】此外，其可進一步包含一結合有生物素的探針，該探針係互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*KRT19*、*CCNBA1*、*CPT1A*、*IFNG*、*CD279*、*CD274*、*ERBB2*、*EGFR*、*FOLR1*、*EPCAM*、及其之組合。

【0302】此外，探針、帶正電材料及標記係如上文所述。

膀胱癌診斷裝置

【0303】本發明的其他態樣提供了一種用於診斷膀胱癌的裝置，其藉由在不擴增之下偵測衍生自來自一樣本的膀胱癌細胞之一基因，其中該裝置包含a)一混合部件，用於將單離自一個體之包含cfDNA的一生物樣本與一帶正電材料混合；b)一獲取部件，用於移除除結合有cfDNA之該帶正電材料外之該樣本；c)一反應部件，用於依序地或同時地將一結合有生物素之能夠互補地結合至膀胱癌中特異地表現之基因的探針；及包含鏈黴抗生物素蛋白與一標記的一奈米顆粒添加至結合有cfDNA之該帶正電材料；d)一偵測部件，用於偵測該標記；及e)一資訊處理部件，用於取決於是否偵測到該標記來判定該樣本中是否存在具有互補於該探針且衍生自膀胱癌的一序列之cfDNA。

【0304】在此情況下，膀胱癌中特異地表現之基因可選自由下列組成之群組中之任一者或多者：*OGT*、*FGFR3*、*TP53*、*NUMA1*、*COCH*、*CELSR3*、*HMOX1*、*KIF1A*、*MGC17624*、*MTAP*、*PFKFB4*、*S100A8*、*RSPH9*、*FOXM1*、*FANCB*、*FANCC*、*FANCD2*、*RUSC1-AS1*、*CACNA1B*、*IMP-1*、*PDE3A*、*POU3F4*、*SOX3*、*DMC1*、*PLXDC2*、*ZNF312*、*SYCP2L*、*HOXA9*、*ISL1*、*ALDH1A3*、及其之組合。

【0305】此外，其可進一步包含一結合有生物素的探針，該探針係互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*KRT19*、*CCNBA1*、*CPT1A*、*IFNG*、*CD279*、*CD274*、*ERBB2*、*EGFR*、*FOLR1*、*EPCAM*、及其之組合。

<乳癌>

用於診斷乳癌的方法

【0306】本發明之一態樣提供一種用於診斷乳癌的方法，其藉由在不擴增之下偵測衍生自來自一樣本的乳癌細胞之一基因，其中該方法包含a)將單離自一個體之包含游離DNA (下稱cfDNA)的一生物樣本與一帶正電材料混合的一步驟；b)單離結合有cfDNA之該帶正電材料的一步驟；c)在混合物中依序地或同時地混合具有互補於該cfDNA的一序列之一探針與一標記的一步驟；d)移除未結合至cfDNA之該探針與該標記的一步驟；及e)偵測該標記的一步驟，其中具有互補於cfDNA的一序列之該探針係互補地結合至已知為一乳癌生物標記之一基因。在此情況下，已知為乳癌生物標記的基因可為編碼甲狀腺癌中過度表現之蛋白質的基因。

【0307】具體而言，具有互補於cfDNA的一序列之探針可互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*MEST*、*NR1D1*、*BIRC5*、*RACGAP1*、*DHCR7*、*STC2*、*AZGP1*、*RBBP8*、*IL6ST*、*MGP*、*TRBC1*、*MMP11*、*COL10A1*、*C10orf64*、*COL11A1*、*POTEG*、*FSIP1*、*HER2*、及其之組合。

【0308】此外，使用單離之生物樣本的目的是偵測存在於該樣本中的cfDNA。因此，樣本中的cfDNA可藉由以各種方式被單離及/或濃縮來使用。在一個實施例中，可使用對核酸具有強親和力的硝化纖維素膜。此外，在一個實施例中，帶正電材料可用於捕獲帶負電之cfDNA。帶正電材料可為奈米顆粒、奈米線、網狀物或帶正電過濾器，但不限於此。在「帶正電材料」的一個實施例中，其可為帶正電奈米結構或帶正電膜。

【0309】在奈米結構的一個例子中，其可包含陽離子聚合物。陽離子聚合物的種類不受限制。陽離子聚合物的一個實施例可為聚乙烯亞胺(PEI)，而且可為陽離子分枝聚合物聚乙烯亞胺。

【0310】 此外，藉由混合標示有鏈黴抗生物素蛋白的奈米線與結合有生物素之PEI的溶液，陽離子分枝聚乙烯亞胺(陽離子分枝PEI)可進一步經由生物素-鏈黴抗生物素蛋白的相互作用來結合至該奈米線。結果是，具有陽離子聚合物聚乙烯亞胺結合至奈米結構表面的奈米結構(PEI/mPpy NW)之奈米顆粒可以高密度和不規則分佈被併入。

【0311】 該些奈米線可甚至在低濃度下以高效率成功地捕獲基因組DNA和cfDNA。特別是，由於奈米線的特性，例如用於與例如DNA之目標分子結合的大表面積和用於促進與DNA相互作用之經增強的移動性，所以有可能有效率地且有效地捕獲cfDNA。

【0312】 在此情況下，目標cfDNA係指待偵測的期望cfDNA。在本說明書中，cfDNA具有雙股。在此情況下，在cfDNA的一部分中，雙股可為退繞的。此外，cfDNA可衍生自乳癌細胞的基因。具體而言，cfDNA可包括在乳癌細胞中過度表現的核酸序列。在癌細胞中過度表現的核酸序列係指在特定癌細胞中過度表現的核酸序列，儘管其在正常細胞中具有適當的表現位準。

【0313】 具體而言，在癌細胞中過度表現的核酸序列的位準或參考(截止)可為當使用標記測量吸光度(光密度)時，OD值是0.010或更多的情況。

【0314】 更具體地，在癌細胞中過度表現的核酸序列的位準或參考中，藉由使用標記測量吸光度，OD值為約0.012或約0.015或更多。在此情況下，用於測量吸光度所照射的波長可根據標記來適當地決定。cfDNA可為DNA，其中雙股是退繞的(DNA之退繞)。此外，cfDNA可適當地根據目的來測定。

【0315】 此外，衍生自乳癌細胞之cfDNA的特徵可在於i)具有比起具有衍生自正常細胞的一雙螺旋結構之cfDNA所具者較低之Tm值，或ii)在具有衍生自正常細胞的一雙螺旋結構之該cfDNA不變性之一條件下變性。

【0316】 此外，該cfDNA能夠在下列條件中之任一者與可互補地結合至

cfDNA之約15聚體至約30聚體探針結合：i)在周遭溫度下靜置約1分鐘至約120分鐘的條件；ii)在約90 °C至約95 °C下加熱約1秒至約3分鐘的條件；iii)在約75 °C至約90 °C下加熱約1秒至約5分鐘的條件；iv)在約60 °C至約75 °C下加熱約30秒至約30分鐘的條件；v)在約25 °C至約40 °C下加熱約10分鐘至約120分鐘的條件；vi)以蛋白酶處理約1分鐘至約30分鐘的條件； vii)以DNase處理約1分鐘至約30分鐘的條件；及viii)以化學物質(例如氫氧化鈉、DMSO、表面活性劑等)處理的條件。

【0317】 在乳癌細胞中過度表現的基因可為選自由下列組成之群組中之任一者：*MUC1*(NCBI基因ID: 4582)、*ACPP*(NCBI基因ID: 55)、*MEST*(NCBI基因ID: 4232)、*TYRO3*(NCBI基因ID: 7301)、*NR1D1*(NCBI基因ID: 9572)、*UBE2C*(NCBI基因ID: 11065)、*BIRC5*(NCBI基因ID: 332)、*RACGAP1*(NCBI基因ID: 29127)、*DHCR7*(NCBI基因ID: 1717)、*STC2*(NCBI基因ID: 8614)、*AZGP1*(NCBI基因ID: 563)、*RBBP8*(NCBI基因ID: 5932)、*IL6ST*(NCBI基因ID: 3572)、*MGP*(NCBI基因ID: 4256)、*TRBC1*(NCBI基因ID: 28639)、*MMP11*(NCBI基因ID: 4320)、*COL10A1*(NCBI基因ID: 1300)、*C10orf64*(NCBI基因ID: 57705)、*COL11A1*(NCBI基因ID: 1301)、*POTEG*(NCBI基因ID: 404785)、*FSIP1*(NCBI基因ID: 161835)、HER2(NCBI基因ID: 2064)、*CPT1A*(NCBI基因ID: 1374)、*IFNG*(NCBI基因ID: 3458)、*CD274*(NCBI基因ID: 29126)、*FOLR1*(NCBI基因ID: 2348)、*EPCAM*(NCBI基因ID: 4072)、及其之組合。

【0318】 在一個實施例中，特異地存在於乳癌的基因可為*MEST*、*NR1D1*、*BIRC5*、*RACGAP1*、*DHCR7*、*STC2*、*AZGP1*、*RBBP8*、*IL6ST*、*MGP*、*TRBC1*、*MMP11*、*COL10A1*、*C10orf64*、*COL11A1*、*POTEG*、*FSIP1*、*HER2*基因，另外地，可另外地偵測一個或多個選自由*MUC1*、*ACPP*、*TYRO3*、*UBE2C*、*CPT1A*、*IFNG*、*CD279*、*CD274*、*ERBB2*、*EGFR*、*FOLR1*與*EPCAM*組成的群組中之另外標記基因，以診斷乳癌。

【0319】 如本案所用，術語"*MUC1*"係指編碼包括CA 15-3 (癌抗原15-3)和CA 27-29的蛋白質的乳癌相關基因。CA15-3已被顯示增加乳癌早期復發的可能性且用作乳癌標記。

【0320】 如本案所用，術語「探針」是指用於偵測cfDNA的DNA或RNA。探針可具有能夠互補地結合至cfDNA的特定序列。具有互補於cfDNA的序列的探針係指具有能夠互補地結合至存在於血漿中欲偵測之所欲雙股cfDNA的核酸序列的探針。在此情況下，探針可為結合有生物素之一者。探針可結合到一結合至生物素結合蛋白之標記。

【0321】 如本案所用，術語「標記」是指用於偵測結合至cfDNA之探針的材料。標記可為奈米顆粒、螢光染料、螢光蛋白或酶。具體而言，標記可為選自由量子點、HRP與螢光蛋白組成之群組中之任一者。在一個實施例中，標記可為GFP (綠色螢光蛋白)、BFP(藍色螢光蛋白)、CFP (青色螢光蛋白)、YFP(黃色螢光蛋白)或HRP (辣根過氧化酶)，但不限於此。

【0322】 標記可為結合有生物素結合蛋白之一者。生物素結合蛋白可為基於抗生物素蛋白之蛋白質、抗生物素蛋白、鏈黴抗生物素蛋白、或中性抗生物素蛋白(neutravidin)，但可不受限地使用，只要其是可特異地結合至生物素之蛋白質即可。在一個實施例中，標記可為結合有鏈黴抗生物素蛋白之一者。

【0323】 如本案所用，術語「鏈黴抗生物素蛋白」是單離自抗生物素鏈黴菌的具有約60 kDa之分子量的四聚體生物素結合蛋白。其與抗生物素蛋白具有極低的同源性，但其結構與抗生物素蛋白極為相似。如同抗生物素蛋白，其具有抗菌活性和對生物素的極高結合能力。另一方面，不同於抗生物素蛋白，其不含有碳水化合物、具有酸性等電點(pI = 5)，並具有比起抗生物素蛋白顯著較低的溶解度。市售的鏈黴抗生物素蛋白，例如Thermo Scientific的Pierce Streptavidin是鏈黴抗生物素蛋白的重組形式，具有約53 kDa的分子量且具有接近中性(PI = 6.8

至7.5)的等電點。相較於抗生物素蛋白，具有缺乏糖基化和低PI的鏈黴抗生物素蛋白具有低位準之非特異性結合(特別是凝集素結合)。鏈黴抗生物素蛋白的該等性質使其被選作用於許多偵測系統的理想試劑。

【0324】 如本案所用，術語「崔特抗生物素蛋白」係指鏈黴抗生物素蛋白的突變體(變體或突變蛋白)，而且是具有對生物素約10倍較慢的解離速率是且具有增加的機械強度和增進的熱穩定性的蛋白質。此外，崔特抗生物素蛋白特異地結合至生物素。

【0325】 本發明的術語「中性抗生物素蛋白」也稱作「去糖基化抗生物素蛋白」且是為了避免天然存在的抗生物素蛋白和鏈黴抗生物素蛋白的主要缺點而製備的。如該名稱所示，中性抗生物素蛋白是將抗生物素蛋白去糖基化所製成的。其為具有降低的分子量(約60k Da)並維持相較於抗生物素蛋白之高度的生物素結合能力的蛋白質。抗生物素蛋白的去糖基化係將凝集素之結合減少至偵測不到的位準，並降低等電點(pI = 約6.3)，以有效地消除非特異性結合至抗生物素蛋白的主要原因。離胺酸殘基仍然可用，所以其可容易地衍生化或複合，像是鏈黴抗生物素蛋白。此外，由於其展現出高度的生物素結合能力和低的非特異性結合，其可以各種方式用作理想的生物素結合蛋白。

【0326】 如本案所用，術語「偵測標記的步驟」係指偵測經由生物素-抗生物素蛋白的反應結合至探針的標記的步驟。標記的偵測可藉由顏色變化、UV吸光度變化、存在或不存在生物發光、螢光變化、或電化學變化來測量。具體而言，用於偵測標記的方法可取決於使用的標記來不同地執行。例如，當HRP用作標記時，該標記可藉由觀察經由過氧化氫與受質之間的反應的顏色反應來偵測。此外，當標記是例如GFP的螢光蛋白時，標記的存在或不存在可藉由觀察照射特定波長的光之後所偵測到的光來偵測。此外，當標記是螢光素酶時，該標記的存在可藉由生物冷光儀測量加入例如螢光素之受質之後所展現出的生物發光來偵

測。

【0327】 此外，本發明的診斷方法可進一步包含使cfDNA變性的步驟。在此情況下，可進行變性步驟，以選擇性地僅使衍生自乳癌的cfDNA變性，而不使正常的雙股cfDNA變性。為此，變性步驟的條件可為在約50 °C至約100 °C下進行約0.1秒至約5分鐘。變性溫度的一個實施例可為約95 °C，變性時間可通常為約0.1秒至約8分鐘。此外，可被變性約1秒、約5秒、約10秒、約30秒、約60秒或約90秒。在一個實施例中，變性cfDNA的步驟可在上述步驟c)前執行。

【0328】 具體而言，該方法可進一步包含在上述步驟c)前，在下列條件中之任一者使結合至帶正電材料之樣本或cfDNA變性的一步驟：i)在周遭溫度下靜置約1分鐘至約10分鐘的條件；ii)在約90 °C至約95 °C下加熱1秒至1分鐘的條件；iii)在約75 °C至約90 °C下加熱約10秒至約3分鐘的條件；iv)在約60 °C至約75 °C下加熱約1分鐘至約30分鐘的條件；v)在約25 °C至約40 °C下加熱約5分鐘至約60分鐘的條件；vi)以蛋白酶處理約1分鐘至約10分鐘的條件；vii)以DNase處理約1分鐘至約10分鐘的條件。此變性步驟並不使衍生自正常細胞的雙股cfDNA變性，而是選擇性地僅使衍生自癌細胞的cfDNA變性，藉此使其更容易與探針結合。變性條件i)至vii)可在獲取樣本之後進行。此外，變性條件i)至vii)可在獲取結合至帶正電材料的cfDNA之後進行。此外，變性條件i)至vii)的溫度、蛋白酶和DNase處理時間可適當地調整，只要其不使穩定cfDNA變性即可。

乳癌診斷套組

【0329】 本發明的其他態樣提供了一種用於診斷乳癌的診斷套組，包含一結合有生物素的探針，該探針互補地結合至乳癌中特異地表現之一基因；一帶正電材料；結合有一基於抗生物素蛋白之蛋白質的一標記；及一手冊。

【0330】 在此情況下，乳癌中特異地表現之基因可選自由下列組成之群組中之任一者或多者：*MEST*、*NR1D1*、*BIRC5*、*RACGAP1*、*DHCR7*、*STC2*、*AZGP1*、

RBBP8、*IL6ST*、*MGP*、*TRBC1*、*MMP11*、*COL10A1*、*C10orf64*、*COL11A1*、*POTEG*、*FSIP1*、*HER2*、及其之組合。

【0331】此外，該手冊可說明該套組係構設成能夠藉由下列流程來診斷乳癌：a)使用該套組內含的一帶正電材料來單離cfDNA，該cfDNA係來自單離自一個體之一生物樣本；b)在該單離之cfDNA中依序地或同時地混合該套組內含的一結合有生物素的探針與該套組內含的一標記；c)移除未結合至cfDNA之該探針與該標記；及d)偵測該標記的信號。

【0332】此外，其可進一步包含一結合有生物素的探針，該探針係互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*MUC1*、*ACPP*、*TYRO3*、*UBE2C*、*CPT1A*、*IFNG*、*CD279*、*CD274*、*ERBB2*、*EGFR*、*FOLR1*、*EPCAM*、及其之組合。

【0333】此外，探針、帶正電材料及標記係如上文所述。

乳癌診斷裝置

【0334】本發明的其他態樣提供了一種用於診斷乳癌的裝置，其藉由在不擴增之下偵測衍生自來自一樣本的乳癌細胞之一基因，其中該裝置包含a)一混合部件，用於將單離自一個體之包含cfDNA的一生物樣本與一帶正電材料混合；b)一獲取部件，用於移除除結合有cfDNA之該帶正電材料外之該樣本；c)一反應部件，用於依序地或同時地將一結合有生物素之能夠互補地結合至乳癌中特異地表現之基因的探針；及包含鏈黴抗生物素蛋白與一標記的一奈米顆粒添加至結合有cfDNA之該帶正電材料；d)一偵測部件，用於偵測該標記；及e)一資訊處理部件，用於取決於是否偵測到該標記來判定該樣本中是否存在具有互補於該探針且衍生自乳癌的一序列之cfDNA。

【0335】在此情況下，乳癌中特異地表現之基因可選自由下列組成之群組中之任一者或多者：*MEST*、*NR1D1*、*BIRC5*、*RACGAP1*、*DHCR7*、*STC2*、*AZGP1*、

RBBP8、*IL6ST*、*MGP*、*TRBC1*、*MMP11*、*COL10A1*、*C10orf64*、*COL11A1*、*POTEG*、*FSIP1*、*HER2*、及其之組合。

【0336】此外，其可進一步包含一結合有生物素的探針，該探針係互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*MUC1*、*ACPP*、*TYRO3*、*UBE2C*、*CPT1A*、*IFNG*、*CD279*、*CD274*、*ERBB2*、*EGFR*、*FOLR1*、*EPCAM*、及其之組合。

<大腸直腸癌>

用於診斷大腸直腸癌的方法

【0337】本發明之一態樣提供一種用於診斷大腸直腸癌的方法，其藉由在不擴增之下偵測衍生自來自一樣本的大腸直腸癌細胞之一基因，其中該方法包含a)將單離自一個體之包含游離DNA (下稱cfDNA)的一生物樣本與一帶正電材料混合的一步驟；b)單離結合有cfDNA之該帶正電材料的一步驟；c)在混合物中依序地或同時地混合具有互補於該cfDNA的一序列之一探針與一標記的一步驟；d)移除未結合至cfDNA之該探針與該標記的一步驟；及e)偵測該標記的一步驟，其中具有互補於cfDNA的一序列之該探針係互補地結合至已知為一大腸直腸癌生物標記之一基因。在此情況下，已知為大腸直腸癌生物標記的基因可為編碼大腸直腸癌中過度表現之蛋白質的基因。

【0338】具體而言，具有互補於cfDNA的一序列之探針可互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*NCKAP1*、*AUNIP*、*NOTUM*、*KRT5*、*TUBB*、*COL6A1*、*JUP*、*CDX2*、*MELTF*、*EFEMP2*、*DEFA5*、*CHEK1*、*MAD2L1*、*ENC1*、*CSE1L*、*RAD51AP1*、*ERICH3*、*SLC7A11*、*KRT23*、*PLAU*、*CDCA1*、*KLK6*、*DPEP1*、*CDH3*、*ANLN*、*CXCL1*、*CTHRC1*、*LCN2*、*HS6ST2*、*EGFL6*、*CXCL3*、*CA9*、*PROX1*、*SPP1*、*CST1*、*CXCL2*、*TSTA3*、*RRM2*、*MMP3*、*MMP7*、*MMP10*、*CXCL5*、*SERPINB5*、*TEAD4*、*BUB1*、*CDC2*、*CLDN2*、*HSPH1*、*LY6G6D*、*PRC1*、

PUS1、*SQLE*、*TTK*、*ECT2*、*RNF183*、*FBXO39*、*TEX38*、*TTLL2*、*PRR7*、*CANP*、*KIAA010*、及其之組合。

【0339】此外，使用單離之生物樣本的目的是偵測存在於該樣本中的cfDNA。因此，樣本中的cfDNA可藉由以各種方式被單離及/或濃縮來使用。在一個實施例中，可使用對核酸具有強親和力的硝化纖維素膜。此外，在一個實施例中，帶正電材料可用於捕獲帶負電之cfDNA。帶正電材料可為奈米顆粒、奈米線、網狀物或帶正電過濾器，但不限於此。在「帶正電材料」的一個實施例中，其可為帶正電奈米結構或帶正電膜。

【0340】在奈米結構的一個例子中，其可包含陽離子聚合物。陽離子聚合物的種類不受限制。陽離子聚合物的一個實施例可為聚乙烯亞胺(PEI)，而且可為陽離子分枝聚合物聚乙烯亞胺。

【0341】此外，藉由混合標示有鏈黴抗生物素蛋白之蛋白質的奈米線與結合有生物素之PEI的溶液，陽離子分枝聚乙烯亞胺(陽離子分枝PEI)可進一步經由生物素-鏈黴抗生物素蛋白之蛋白質的相互作用來結合至該奈米線。結果是，具有陽離子聚合物聚乙烯亞胺結合至奈米結構表面的奈米結構(PEI/mPpy NW)之奈米顆粒可以高密度和不規則分佈被併入。

【0342】該些奈米線可甚至在低濃度下以高效率成功地捕獲基因組DNA和cfDNA。特別是，由於奈米線的特性，例如用於與例如DNA之目標分子結合的大表面積和用於促進與DNA相互作用之經增強的移動性，所以有可能有效率地且有效地捕獲cfDNA。

【0343】在此情況下，目標cfDNA係指待偵測的期望cfDNA。在本說明書中，cfDNA具有雙股。在此情況下，在cfDNA的一部分中，雙股可為退繞的。此外，cfDNA可衍生自大腸直腸癌細胞的基因。具體而言，cfDNA可包括在大腸直腸癌細胞中過度表現的核酸序列。在癌細胞中過度表現的核酸序列係指在特定

癌細胞中過度表現的核酸序列，儘管其在正常細胞中具有適當的表現位準。

【0344】 具體而言，在癌細胞中過度表現的核酸序列的位準或參考(截止)可為當使用標記測量吸光度(光密度)時，OD值是0.010或更多的情況。更具體地，在癌細胞中過度表現的核酸序列的位準或參考中，藉由使用標記測量吸光度，OD值為約0.012或約0.015或更多。在此情況下，用於測量吸光度所照射的波長可根據標記來適當地決定。cfDNA可為DNA，其中雙股是退繞的(DNA之退繞)。此外，cfDNA可適當地根據目的來測定。

【0345】 此外，衍生自大腸直腸癌細胞之cfDNA的特徵可在於i)具有比起具有衍生自正常細胞的一雙螺旋結構之cfDNA所具者較低之Tm值，或ii)在具有衍生自正常細胞的一雙螺旋結構之該cfDNA不變性之一條件下變性。

【0346】 此外，該cfDNA能夠在下列條件中之任一者與可互補地結合至cfDNA之約15聚體至約30聚體探針結合：i)在周遭溫度下靜置約1分鐘至約120分鐘的條件；ii)在約90 °C至約95 °C下加熱約1秒至約3分鐘的條件；iii)在約75 °C至約90 °C下加熱約1秒至約5分鐘的條件；iv)在約60 °C至約75 °C下加熱約30秒至約30分鐘的條件；v)在約25 °C至約40 °C下加熱約10分鐘至約120分鐘的條件；vi)以蛋白酶處理約1分鐘至約30分鐘的條件；vii)以DNase處理約1分鐘至約30分鐘的條件；及viii)以化學物質(例如氫氧化鈉、DMSO、表面活性劑等)處理的條件。

【0347】 在大腸直腸癌細胞中過度表現的基因可為選自由下列組成之群組中之任一者：*ACPP*(NCBI基因ID: 55)、*FLU3*(NCBI基因ID: 837968)、*TYRO3*(NCBI基因ID: 7301)、*NCKAP1*(NCBI基因ID: 10787)、*AUNIP*(NCBI基因ID: 79000)、*NOTUM*(NCBI基因ID: 147111)、*KRT5*(NCBI基因ID: 3852)、*TUBB*(NCBI基因ID: 203068)、*COL6A1*(NCBI基因ID: 1291)、*JUP*(NCBI基因ID: 3728)、*COTL1*(NCBI基因ID: 23406)、*CK7*(NCBI基因ID: 3855)、*CK20*(NCBI基因ID: 54474)、*CDX2*(NCBI基因ID: 1045)、*MUC2*(NCBI基因ID: 4583)、*MELTF*(NCBI基因ID:

4241)、*SDC2*(NCBI基因ID: 6383)、*EFEMP2*(NCBI基因ID: 30008)、*DEFA5*(NCBI基因ID: 1670)、*ASB9*(NCBI基因ID: 140462)、*CHEK1*(NCBI基因ID: 1111)、*MAD2L1*(NCBI基因ID: 4085)、*ENC1*(NCBI基因ID: 8507)、*CSE1L*(NCBI基因ID: 1434)、*RAD51AP1*(NCBI基因ID: 10635)、*ERICH3*(NCBI基因ID: 127524)、*SLC7A11*(NCBI基因ID: 23657)、*KRT23*(NCBI基因ID: 25984)、*PLAU*(NCBI基因ID: 5328)、*CCNB1*(NCBI基因ID: 891)、*MELK*(NCBI基因ID: 9833)、*CDCA1*(NCBI基因ID: 83540)、*KLK6*(NCBI基因ID: 5653)、*CKS2*(NCBI基因ID: 1164)、*IFITM1*(NCBI基因ID: 8519)、*DPEP1*(NCBI基因ID: 1800)、*CDH3*(NCBI基因ID: 1001)、*ANLN*(NCBI基因ID: 54443)、*CXCL1*(NCBI基因ID: 2919)、*CTHRC1*(NCBI基因ID: 115908)、*CEACAM6*(NCBI基因ID: 4680)、*LCN2*(NCBI基因ID: 3934)、*HS6ST2*(NCBI基因ID: 90161)、*EGFL6*(NCBI基因ID: 25975)、*CXCL3*(NCBI基因ID: 2921)、*CA9*(NCBI基因ID: 768)、*ATAD2*(NCBI基因ID: 29028)、*PROX1*(NCBI基因ID: 5629)、*SPP1*(NCBI基因ID: 6696)、*CST1*(NCBI基因ID: 1469)、*CXCL2*(NCBI基因ID: 2920)、*TSTA3*(NCBI基因ID: 7264)、*RRM2*(NCBI基因ID: 6241)、*MMP3*(NCBI基因ID: 4314)、*MMP7*(NCBI基因ID: 4316)、*MMP10*(NCBI基因ID: 4319)、*CXCL5*(NCBI基因ID: 6374)、*SERPINB5*(NCBI基因ID: 5268)、*TEAD4*(NCBI基因ID: 7004)、*BUB1*(NCBI基因ID: 699)、*CDC2*(NCBI基因ID: 983)、*CLDN2*(NCBI基因ID: 9075)、*HSPH1*(NCBI基因ID: 10808)、*LY6G6D*(NCBI基因ID: 58530)、*PRC1*(NCBI基因ID: 9055)、*PUS1*(NCBI基因ID: 80324)、*SQLE*(NCBI基因ID: 6713)、*TOP2A*(NCBI基因ID: 7153)、*TTK*(NCBI基因ID: 7272)、*DSCC1*(NCBI基因ID: 79075)、*ECT2*(NCBI基因ID: 1894)、*RNF183*(NCBI基因ID: 138065)、*FBXO39*(NCBI基因ID: 162517)、*TEX38*(NCBI基因ID: 374973)、*TTLL2*(NCBI基因ID: 83887)、*PRR7*(NCBI基因ID: 80758)、*CANP*(NCBI基因ID: 823)、*KIAA0101*(NCBI基因ID: 9768)、*CPT1A*(NCBI基因ID: 1374)、*IFNG*(NCBI

基因ID: 3458)、*CD274*(NCBI基因ID: 29126)、*FOLR1*(NCBI基因ID: 2348)、*EPCAM*(NCBI基因ID: 4072)、*KRAS*(NCBI基因ID: 3845)、及其之組合。

【0348】在一個實施例中，特異地存在於大腸直腸癌的基因可為*NCKAP1*、*AUNIP*、*NOTUM*、*KRT5*、*TUBB*、*COL6A1*、*JUP*、*CDX2*、*MELTF*、*EFEMP2*、*DEFA5*、*CHEK1*、*MAD2L1*、*ENC1*、*CSE1L*、*RAD51AP1*、*ERICH3*、*SLC7A11*、*KRT23*、*PLAU*、*CDCA1*、*KLK6*、*DPEP1*、*CDH3*、*ANLN*、*CXCL1*、*CTHRC1*、*LCN2*、*HS6ST2*、*EGFL6*、*CXCL3*、*CA9*、*PROX1*、*SPP1*、*CST1*、*CXCL2*、*TSTA3*、*RRM2*、*MMP3*、*MMP7*、*MMP10*、*CXCL5*、*SERPINB5*、*TEAD4*、*BUB1*、*CDC2*、*CLDN2*、*HSPH1*、*LY6G6D*、*PRC1*、*PUS1*、*SQLE*、*TTK*、*ECT2*、*RNF183*、*FBXO39*、*TEX38*、*TTLL2*、*PRR7*、*CANP*、*KIAA010*基因，另外地，可另外地偵測一個或多個選自由*ACPP*、*FLU3*、*TYRO3*、*COTL1*、*CK7*、*CK20*、*MUC2*、*SDC2*、*ASB9*、*CCNB1*、*MELK*、*CKS2*、*IFITM1*、*CEACAM6*、*ATAD2*、*TOP2A*、*CPT1A*、*DSCC1*、*IFNG*、*CD279*、*CD274*、*ERBB2*、*EGFR*、*FOLR1*或*EPCAM*組成的群組中之另外標記基因，以診斷大腸直腸癌。

【0349】如本案所用，術語"FLU3"係指編碼包括CA19-9(癌抗原19-9)的蛋白質的基因。

【0350】如本案所用，術語「探針」是指用於偵測cfDNA的DNA或RNA。探針可具有能夠互補地結合至cfDNA的特定序列。具有互補於cfDNA的序列的探針係指具有能夠互補地結合至存在於血漿中欲偵測之所欲雙股cfDNA的核酸序列的探針。在此情況下，探針可為結合有生物素之一者。探針可結合到一結合至生物素結合蛋白之標記。

【0351】如本案所用，術語「標記」是指用於偵測結合至cfDNA之探針的材料。標記可為奈米顆粒、螢光染料、螢光蛋白或酶。具體而言，標記可為選自由量子點、HRP與螢光蛋白組成之群組中之任一者。在一個實施例中，標記可為

GFP (綠色螢光蛋白)、BFP(藍色螢光蛋白)、CFP (青色螢光蛋白)、YFP(黃色螢光蛋白)或HRP (辣根過氧化酶)，但不限於此。

【0352】 標記可為結合有生物素結合蛋白之一者。生物素結合蛋白可為基於抗生物素蛋白之蛋白質、抗生物素蛋白、鏈黴抗生物素蛋白、或中性抗生物素蛋白(neutravidin)，但可不受限地使用，只要其是可特異地結合至生物素之蛋白質即可。在一個實施例中，標記可為結合有鏈黴抗生物素蛋白之一者。

【0353】 如本案所用，術語「鏈黴抗生物素蛋白」是單離自抗生物素鏈黴菌的具有約60 kDa之分子量的四聚體生物素結合蛋白。其與抗生物素蛋白具有極低的同源性，但其結構與抗生物素蛋白極為相似。如同抗生物素蛋白，其具有抗菌活性和對生物素的極高結合能力。另一方面，不同於抗生物素蛋白，其不含有碳水化合物、具有酸性等電點(pI = 5)，並具有比起抗生物素蛋白顯著較低的溶解度。市售的鏈黴抗生物素蛋白，例如Thermo Scientific的Pierce Streptavidin是鏈黴抗生物素蛋白的重組形式，具有約53 kDa的分子量且具有接近中性(PI = 6.8至7.5)的等電點。相較於抗生物素蛋白，具有缺乏糖基化和低PI的鏈黴抗生物素蛋白具有低位準之非特異性結合(特別是凝集素結合)。鏈黴抗生物素蛋白的該等性質使其被選作用於許多偵測系統的理想試劑。

【0354】 如本案所用，術語「崔特抗生物素蛋白」係指鏈黴抗生物素蛋白的突變體(變體或突變蛋白)，而且是具有對生物素約10倍較慢的解離速率是且具有增加的機械強度和增進的熱穩定性的蛋白質。此外，崔特抗生物素蛋白特異地結合至生物素。

【0355】 本發明的術語「中性抗生物素蛋白」也稱作「去糖基化抗生物素蛋白」且是為了避免天然存在的抗生物素蛋白和鏈黴抗生物素蛋白的主要缺點而製備的。如該名稱所示，中性抗生物素蛋白是將抗生物素蛋白去糖基化所製成的。其為具有降低的分子量(約60k Da)並維持相較於抗生物素蛋白之高度的生物

素結合能力的蛋白質。抗生物素蛋白的去糖基化係將凝集素之結合減少至偵測不到的位準，並降低等電點(pI = 約6.3)，以有效地消除非特異性結合至抗生物素蛋白的主要原因。離胺酸殘基仍然可用，所以其可容易地衍生化或複合，像是鏈黴抗生物素蛋白。此外，由於其展現出高度的生物素結合能力和低的非特異性結合，其可以各種方式用作理想的生物素結合蛋白。

【0356】 如本案所用，術語「偵測標記的步驟」係指偵測經由生物素-抗生物素蛋白的反應結合至探針的標記的步驟。標記的偵測可藉由顏色變化、UV吸光度變化、存在或不存在生物發光、螢光變化、或電化學變化來測量。具體而言，用於偵測標記的方法可取決於使用的標記來不同地執行。例如，當HRP用作標記時，該標記可藉由觀察經由過氧化氫與受質之間的反應的顏色反應來偵測。此外，當標記是例如GFP的螢光蛋白時，標記的存在或不存在可藉由觀察照射特定波長的光之後所偵測到的光來偵測。此外，當標記是螢光素酶時，該標記的存在可藉由生物冷光儀測量加入例如螢光素之受質之後所展現出的生物發光來偵測。

【0357】 此外，本發明的診斷方法可進一步包含使cfDNA變性的步驟。在此情況下，可進行變性步驟，以選擇性地僅使衍生自大腸直腸癌的cfDNA變性，而不使正常的雙股cfDNA變性。為此，變性步驟的條件可為在約50 °C至約100 °C下進行約0.1秒至約5分鐘。變性溫度的一個實施例可為約95 °C，變性時間可通常為約0.1秒至約8分鐘。此外，可被變性約1秒、約5秒、約10秒、約30秒、約60秒或約90秒。在一個實施例中，變性cfDNA的步驟可在上述步驟c)前執行。

【0358】 具體而言，該方法可進一步包含在上述步驟c)前，在下列條件中之任一者使結合至帶正電材料之樣本或cfDNA變性的一步驟：i)在周遭溫度下靜置約1分鐘至約10分鐘的條件；ii)在約90 °C至約95 °C下加熱1秒至1分鐘的條件；iii)在約75 °C至約90 °C下加熱約10秒至約3分鐘的條件；iv)在約60 °C至約75 °C

下加熱約1分鐘至約30分鐘的條件；v)在約25 °C至約40 °C下加熱約5分鐘至約60分鐘的條件；vi)以蛋白酶處理約1分鐘至約10分鐘的條件；vii)以DNase處理約1分鐘至約10分鐘的條件。此變性步驟並不使衍生自正常細胞的雙股cfDNA變性，而是選擇性地僅使衍生自癌細胞的cfDNA變性，藉此使其更容易與探針結合。變性條件i)至vii)可在獲取樣本之後進行。此外，變性條件i)至vii)可在獲取結合至帶正電材料的cfDNA之後進行。此外，變性條件i)至vii)的溫度、蛋白酶和DNase處理時間可適當地調整，只要其不使穩定cfDNA變性即可。

大腸直腸癌診斷套組

【0359】 本發明的其他態樣提供了一種用於診斷大腸直腸癌的診斷套組，包含一結合有生物素的探針，該探針互補地結合至大腸直腸癌中特異地表現之一基因；一帶正電材料；結合有一基於抗生物素蛋白之蛋白質的一標記；及一手冊。

【0360】 在此情況下，大腸直腸癌中特異地表現之基因可選自由下列組成之群組中之任一者或多者：*NCKAP1*、*AUNIP*、*NOTUM*、*KRT5*、*TUBB*、*COL6A1*、*JUP*、*CDX2*、*MELTF*、*EFEMP2*、*DEFA5*、*CHEK1*、*MAD2L1*、*ENC1*、*CSE1L*、*RAD51AP1*、*ERICH3*、*SLC7A11*、*KRT23*、*PLAU*、*CDCA1*、*KLK6*、*DPEP1*、*CDH3*、*ANLN*、*CXCL1*、*CTHRC1*、*LCN2*、*HS6ST2*、*EGFL6*、*CXCL3*、*CA9*、*PROX1*、*SPP1*、*CST1*、*CXCL2*、*TSTA3*、*RRM2*、*MMP3*、*MMP7*、*MMP10*、*CXCL5*、*SERPINB5*、*TEAD4*、*BUB1*、*CDC2*、*CLDN2*、*HSPH1*、*LY6G6D*、*PRC1*、*PUS1*、*SQLE*、*TTK*、*ECT2*、*RNF183*、*FBXO39*、*TEX38*、*TTLL2*、*PRR7*、*CANP*、*KIAA0101*、及其之組合。

【0361】 此外，該手冊可說明該套組係構設成能夠藉由下列流程來診斷大腸直腸癌：a)使用該套組內含的一帶正電材料來單離cfDNA，該cfDNA係來自單離自一個體之一生物樣本；b)在該單離之cfDNA中依序地或同時地混合該套組內

含的一結合有生物素的探針與該套組內含的一標記；c)移除未結合至cfDNA之該探針與該標記；及d)偵測該標記的信號。

【0362】此外，其可進一步包含一結合有生物素的探針，該探針係互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*ACPP*、*FLU3*、*TYRO3*、*COTL1*、*CK7*、*CK20*、*MUC2*、*SDC2*、*ASB9*、*CCNB1*、*MELK*、*CKS2*、*IFITM1*、*CEACAM6*、*ATAD2*、*TOP2A*、*CPT1A*、*DSCC1*、*IFNG*、*CD279*、*CD274*、*ERBB2*、*EGFR*、*FOLR1*、*EPCAM*、及其之組合。

【0363】此外，探針、帶正電材料及標記係如上文所述。

大腸直腸癌診斷裝置

【0364】本發明的其他態樣提供了一種用於診斷大腸直腸癌的裝置，其藉由在不擴增之下偵測衍生自來自一樣本的大腸直腸癌細胞之一基因，其中該裝置包含a)一混合部件，用於將單離自一個體之包含cfDNA的一生物樣本與一帶正電材料混合；b)一獲取部件，用於移除除結合有cfDNA之該帶正電材料外之該樣本；c)一反應部件，用於依序地或同時地將一結合有生物素之能夠互補地結合至大腸直腸癌中特異地表現之基因的探針；及包含鏈黴抗生物素蛋白與一標記的一奈米顆粒添加至結合有cfDNA之該帶正電材料；d)一偵測部件，用於偵測該標記；及e)一資訊處理部件，用於取決於是否偵測到該標記來判定該樣本中是否存在具有互補於該探針且衍生自大腸直腸癌的一序列之cfDNA。

【0365】在此情況下，大腸直腸癌中特異地表現之基因可選自由下列組成之群組中之任一者或多者：*NCKAP1*、*AUNIP*、*NOTUM*、*KRT5*、*TUBB*、*COL6A1*、*JUP*、*CDX2*、*MELTF*、*EFEMP2*、*DEFA5*、*CHEK1*、*MAD2L1*、*ENC1*、*CSE1L*、*RAD51AP1*、*ERICH3*、*SLC7A11*、*KRT23*、*PLAU*、*CDCA1*、*KLK6*、*DPEP1*、*CDH3*、*ANLN*、*CXCL1*、*CTHRC1*、*LCN2*、*HS6ST2*、*EGFL6*、*CXCL3*、*CA9*、*PROX1*、*SPP1*、*CST1*、*CXCL2*、*TSTA3*、*RRM2*、*MMP3*、*MMP7*、*MMP10*、*CXCL5*、*SERPINB5*、

TEAD4、*BUB1*、*CDC2*、*CLDN2*、*HSPH1*、*LY6G6D*、*PRC1*、*PUS1*、*SQLE*、*TTK*、*ECT2*、*RNF183*、*FBXO39*、*TEX38*、*TTLL2*、*PRR7*、*CANP*、*KIAA0101*、及其之組合。

【0366】此外，其可進一步包含一結合有生物素的探針，該探針係互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*ACPP*、*FLU3*、*TYRO3*、*COTL1*、*CK7*、*CK20*、*MUC2*、*SDC2*、*ASB9*、*CCNB1*、*MELK*、*CKS2*、*IFITM1*、*CEACAM6*、*ATAD2*、*TOP2A*、*CPT1A*、*DSCC1*、*IFNG*、*CD279*、*CD274*、*ERBB2*、*EGFR*、*FOLR1*、*EPCAM*、及其之組合。

<膽管癌>

用於診斷膽管癌的方法

【0367】本發明之一態樣提供一種用於診斷膽管癌的方法，其藉由在不擴增之下偵測衍生自來自一樣本的膽管癌細胞之一基因，其中該方法包含a)將單離自一個體之包含游離DNA (下稱cfDNA)的一生物樣本與一帶正電材料混合的一步驟；b)單離結合有cfDNA之該帶正電材料的一步驟；c)在混合物中依序地或同時地混合具有互補於該cfDNA的一序列之一探針與一標記的一步驟；d)移除未結合至cfDNA之該探針與該標記的一步驟；及e)偵測該標記的一步驟，其中具有互補於cfDNA的一序列之該探針係互補地結合至已知為一膽管癌生物標記之一基因。在此情況下，已知為膽管癌生物標記的基因可為編碼膽管癌中過度表現之蛋白質的基因。

【0368】具體而言，具有互補於cfDNA的一序列之探針可互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*MUC16*、*ASH1L*、*DOCK70*、及其之組合。

【0369】此外，使用單離之生物樣本的目的是偵測存在於該樣本中的cfDNA。因此，樣本中的cfDNA可藉由以各種方式被單離及/或濃縮來使用。在一

個實施例中，可使用對核酸具有強親和力的硝化纖維素膜。此外，在一個實施例中，帶正電材料可用於捕獲帶負電之cfDNA。帶正電材料可為奈米顆粒、奈米線、網狀物或帶正電過濾器，但不限於此。在「帶正電材料」的一個實施例中，其可為帶正電奈米結構或帶正電膜。

【0370】 在奈米結構的一個例子中，其可包含陽離子聚合物。陽離子聚合物的種類不受限制。陽離子聚合物的一個實施例可為聚乙烯亞胺(PEI)，而且可為陽離子分枝聚合物聚乙烯亞胺。

【0371】 此外，藉由混合標示有鏈黴抗生物素蛋白的奈米線與結合有生物素之PEI的溶液，陽離子分枝聚乙烯亞胺(陽離子分枝PEI)可進一步經由生物素-鏈黴抗生物素蛋白的相互作用來結合至該奈米線。結果是，具有陽離子聚合物聚乙烯亞胺結合至奈米結構表面的奈米結構(PEI/mPpy NW)之奈米顆粒可以高密度和不規則分佈被併入。

【0372】 該些奈米線可甚至在低濃度下以高效率成功地捕獲基因組DNA和cfDNA。特別是，由於奈米線的特性，例如用於與例如DNA之目標分子結合的大表面積和用於促進與DNA相互作用之經增強的移動性，所以有可能有效率地且有效地捕獲cfDNA。

【0373】 在此情況下，目標cfDNA係指待偵測的期望cfDNA。在本說明書中，cfDNA具有雙股。在此情況下，在cfDNA的一部分中，雙股可為退繞的。此外，cfDNA可衍生自膽管癌細胞的基因。具體而言，cfDNA可包括在膽管癌細胞中過度表現的核酸序列。在癌細胞中過度表現的核酸序列係指在特定癌細胞中過度表現的核酸序列，儘管其在正常細胞中具有適當的表現位準。

【0374】 具體而言，在癌細胞中過度表現的核酸序列的位準或參考(截止)可為當使用標記測量吸光度(光密度)時，OD值是0.010或更多的情況。

【0375】 更具體地，在癌細胞中過度表現的核酸序列的位準或參考中，藉

由使用標記測量吸光度，OD值為約0.012或約0.015或更多。在此情況下，用於測量吸光度所照射的波長可根據標記來適當地決定。cfDNA可為DNA，其中雙股是退繞的(DNA之退繞)。此外，cfDNA可適當地根據目的來測定。

【0376】 此外，衍生自膽管癌細胞之cfDNA的特徵可在於i)具有比起具有衍生自正常細胞的一雙螺旋結構之cfDNA所具者較低之Tm值，或ii)在具有衍生自正常細胞的一雙螺旋結構之該cfDNA不變性之一條件下變性。

【0377】 此外，該cfDNA能夠在下列條件中之任一者與可互補地結合至cfDNA之約15聚體至約30聚體探針結合：i)在周遭溫度下靜置約1分鐘至約120分鐘的條件；ii)在約90 °C至約95 °C下加熱約1秒至約3分鐘的條件；iii)在約75 °C至約90 °C下加熱約1秒至約5分鐘的條件；iv)在約60 °C至約75 °C下加熱約30秒至約30分鐘的條件；v)在約25 °C至約40 °C下加熱約10分鐘至約120分鐘的條件；vi)以蛋白酶處理約1分鐘至約30分鐘的條件；vii)以DNase處理約1分鐘至約30分鐘的條件；及viii)以化學物質(例如氫氧化鈉、DMSO、表面活性劑等)處理的條件。

【0378】 在膽管癌細胞中過度表現的基因可為選自由下列組成之群組中之任一者：*ACPP*(NCBI基因ID: 55)、*FLU3*(NCBI基因ID: 837968)、*MUC16*(NCBI基因ID: 94025)、*ASH1L*(NCBI基因ID: 55870)、*DOCK7*(NCBI基因ID: 85440)、*CPT1A*(NCBI基因ID: 1374)、*IFNG*(NCBI基因ID: 3458)、*CD274*(NCBI基因ID: 29126)、*FOLR1*(NCBI基因ID: 2348)、*EPCAM*(NCBI基因ID: 4072)、*CA125*(NCBI基因ID: 94025)、*CEACAM5*(NCBI基因ID: 1048)、及其之組合。

【0379】 在一個實施例中，特異地存在於膽管癌的基因可為*MUC16*、*ASH1L*、*DOCK70*基因，另外地，可另外地偵測*ACPP*、*FLU3*、*CPT1A*、*DSCC1*、*IFNG*、*CD279*、*CD274*、*ERBB2*、*EGFR*、*FOLR1*或*EPCAM*基因，以診斷膽管癌。

【0380】 如本案所用，術語"*MUC16*"係指編碼CA-125 (癌抗原125)的基因。CA-125係用作腫瘤標記或生物標記，其在某些癌症類型的一些患者的血液中為

陽性。

【0381】 如本案所用，術語「探針」是指用於偵測cfDNA的DNA或RNA。探針可具有能夠互補地結合至cfDNA的特定序列。具有互補於cfDNA的序列的探針係指具有能夠互補地結合至存在於血漿中欲偵測之所欲雙股cfDNA的核酸序列的探針。在此情況下，探針可為結合有生物素之一者。探針可結合到一結合至生物素結合蛋白之標記。

【0382】 如本案所用，術語「標記」是指用於偵測結合至cfDNA之探針的材料。標記可為奈米顆粒、螢光染料、螢光蛋白或酶。具體而言，標記可為選自由量子點、HRP與螢光蛋白組成之群組中之任一者。在一個實施例中，標記可為GFP (綠色螢光蛋白)、BFP(藍色螢光蛋白)、CFP (青色螢光蛋白)、YFP(黃色螢光蛋白)或HRP (辣根過氧化酶)，但不限於此。

【0383】 標記可為結合有生物素結合蛋白之一者。生物素結合蛋白可為基於抗生物素蛋白之蛋白質、抗生物素蛋白、鏈黴抗生物素蛋白、或中性抗生物素蛋白(neutravidin)，但可不受限地使用，只要其是可特異地結合至生物素之蛋白質即可。在一個實施例中，標記可為結合有鏈黴抗生物素蛋白之一者。

【0384】 如本案所用，術語「鏈黴抗生物素蛋白」是單離自抗生物素鏈黴菌的具有約60 kDa之分子量的四聚體生物素結合蛋白。其與抗生物素蛋白具有極低的同源性，但其結構與抗生物素蛋白極為相似。如同抗生物素蛋白，其具有抗菌活性和對生物素的極高結合能力。另一方面，不同於抗生物素蛋白，其不含有碳水化合物、具有酸性等電點(pI = 5)，並具有比起抗生物素蛋白顯著較低的溶解度。市售的鏈黴抗生物素蛋白，例如Thermo Scientific的Pierce Streptavidin是鏈黴抗生物素蛋白的重組形式，具有約53 kDa的分子量且具有接近中性(PI = 6.8至7.5)的等電點。相較於抗生物素蛋白，具有缺乏糖基化和低PI的鏈黴抗生物素蛋白具有低位準之非特異性結合(特別是凝集素結合)。鏈黴抗生物素蛋白的該等

性質使其被選作用於許多偵測系統的理想試劑。

【0385】 如本案所用，術語「崔特抗生物素蛋白」係指鏈黴抗生物素蛋白的突變體(變體或突變蛋白)，而且是具有對生物素約10倍較慢的解離速率是且具有增加的機械強度和增進的熱穩定性的蛋白質。此外，崔特抗生物素蛋白特異地結合至生物素。

【0386】 本發明的術語「中性抗生物素蛋白」也稱作「去糖基化抗生物素蛋白」且是為了避免天然存在的抗生物素蛋白和鏈黴抗生物素蛋白的主要缺點而製備的。如該名稱所示，中性抗生物素蛋白是將抗生物素蛋白去糖基化所製成的。其為具有降低的分子量(約60k Da)並維持相較於抗生物素蛋白之高度的生物素結合能力的蛋白質。抗生物素蛋白的去糖基化係將凝集素之結合減少至偵測不到的位準，並降低等電點(pI = 約6.3)，以有效地消除非特異性結合至抗生物素蛋白的主要原因。離胺酸殘基仍然可用，所以其可容易地衍生化或複合，像是鏈黴抗生物素蛋白。此外，由於其展現出高度的生物素結合能力和低的非特異性結合，其可以各種方式用作理想的生物素結合蛋白。

【0387】 如本案所用，術語「偵測標記的步驟」係指偵測經由生物素-抗生物素蛋白的反應結合至探針的標記的步驟。標記的偵測可藉由顏色變化、UV吸光度變化、存在或不存在生物發光、螢光變化、或電化學變化來測量。具體而言，用於偵測標記的方法可取決於使用的標記來不同地執行。例如，當HRP用作標記時，該標記可藉由觀察經由過氧化氫與受質之間的反應的顏色反應來偵測。此外，當標記是例如GFP的螢光蛋白時，標記的存在或不存在可藉由觀察照射特定波長的光之後所偵測到的光來偵測。此外，當標記是螢光素酶時，該標記的存在可藉由生物冷光儀測量加入例如螢光素之受質之後所展現出的生物發光來偵測。

【0388】 此外，本發明的診斷方法可進一步包含使cfDNA變性的步驟。在

此情況下，可進行變性步驟，以選擇性地僅使衍生自膽管癌的cfDNA變性，而不使正常的雙股cfDNA變性。為此，變性步驟的條件可為在約50 °C至約100 °C下進行約0.1秒至約5分鐘。變性溫度的一個實施例可為約95 °C，變性時間可通常為約0.1秒至約8分鐘。此外，可被變性約1秒、約5秒、約10秒、約30秒、約60秒或約90秒。在一個實施例中，變性cfDNA的步驟可在上述步驟c)前執行。

【0389】 具體而言，該方法可進一步包含在上述步驟c)前，在下列條件中之任一者使結合至帶正電材料之樣本或cfDNA變性的一步驟：i)在周遭溫度下靜置約1分鐘至約10分鐘的條件；ii)在約90 °C至約95 °C下加熱1秒至1分鐘的條件；iii)在約75 °C至約90 °C下加熱約10秒至約3分鐘的條件；iv)在約60 °C至約75 °C下加熱約1分鐘至約30分鐘的條件；v)在約25 °C至約40 °C下加熱約5分鐘至約60分鐘的條件；vi)以蛋白酶處理約1分鐘至約10分鐘的條件；vii)以DNase處理約1分鐘至約10分鐘的條件。此變性步驟並不使衍生自正常細胞的雙股cfDNA變性，而是選擇性地僅使衍生自癌細胞的cfDNA變性，藉此使其更容易與探針結合。變性條件i)至vii)可在獲取樣本之後進行。此外，變性條件i)至vii)可在獲取結合至帶正電材料的cfDNA之後進行。此外，變性條件i)至vii)的溫度、蛋白酶和DNase處理時間可適當地調整，只要其不使穩定cfDNA變性即可。

膽管癌診斷套組

【0390】 本發明的其他態樣提供了一種用於診斷膽管癌的診斷套組，包含一結合有生物素的探針，該探針互補地結合至膽管癌中特異地表現之一基因；一帶正電材料；結合有一基於抗生物素蛋白之蛋白質的一標記；及一手冊。

【0391】 在此情況下，膽管癌中特異地表現之基因可選自由下列組成之群組中之任一者或多者：*MUC16*、*ASH1L*、*DOCK7*、及其之組合。

【0392】 此外，該手冊可說明該套組係構設成能夠藉由下列流程來診斷膽管癌：a)使用該套組內含的一帶正電材料來單離cfDNA，該cfDNA係來自單離自

一個體之一生物樣本；b)在該單離之cfDNA中依序地或同時地混合該套組內含的一結合有生物素的探針與該套組內含的一標記；c)移除未結合至cfDNA之該探針與該標記；及d)偵測該標記的信號。

【0393】 此外，其可進一步包含一結合有生物素的探針，該探針係互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*ACPP*、*FLU3*、*CPT1A*、*DSCC1*、*IFNG*、*CD279*、*CD274*、*ERBB2*、*EGFR*、*FOLR1*、*EPCAM*、及其之組合。

【0394】 此外，探針、帶正電材料及標記係如上文所述。

膽管癌診斷裝置

【0395】 本發明的其他態樣提供了一種用於診斷膽管癌的裝置，其藉由在不擴增之下偵測衍生自來自一樣本的膽管癌細胞之一基因，其中該裝置包含a)一混合部件，用於將單離自一個體之包含cfDNA的一生物樣本與一帶正電材料混合；b)一獲取部件，用於移除除結合有cfDNA之該帶正電材料外之該樣本；c)一反應部件，用於依序地或同時地將一結合有生物素之能夠互補地結合至膽管癌中特異地表現之基因的探針；及包含鏈黴抗生物素蛋白與一標記的一奈米顆粒添加至結合有cfDNA之該帶正電材料；d)一偵測部件，用於偵測該標記；及e)一資訊處理部件，用於取決於是否偵測到該標記來判定該樣本中是否存在具有互補於該探針且衍生自膽管癌的一序列之cfDNA。

【0396】 在此情況下，膽管癌中特異地表現之基因可選自由下列組成之群組中之任一者或多者：*ACPP*、*FLU3*、*CPT1A*、*DSCC1*、*IFNG*、*CD279*、*CD274*、*ERBB2*、*EGFR*、*FOLR1*、*EPCAM*、及其之組合。

【0397】 此外，其可進一步包含一結合有生物素的探針，該探針係互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*ACPP*、*FLU3*、*CPT1A*、*DSCC1*、*IFNG*、*CD279*、*CD274*、*ERBB2*、*EGFR*、*FOLR1*、*EPCAM*、及其之組合。

<胃癌>

用於診斷胃癌的方法

【0398】 本發明之一態樣提供一種用於診斷胃癌的方法，其藉由在不擴增之下偵測衍生自來自一樣本的胃癌細胞之一基因，其中該方法包含a)將單離自一個體之包含游離DNA (下稱cfDNA)的一生物樣本與一帶正電材料混合的一步驟；b)單離結合有cfDNA之該帶正電材料的一步驟；c)在混合物中依序地或同時地混合具有互補於該cfDNA的一序列之一探針與一標記的一步驟；d)移除未結合至cfDNA之該探針與該標記的一步驟；及e)偵測該標記的一步驟，其中具有互補於cfDNA的一序列之該探針係互補地結合至已知為一胃癌生物標記之一基因。在此情況下，已知為胃癌生物標記的基因可為編碼胃癌中過度表現之蛋白質的基因。

【0399】 具體而言，具有互補於cfDNA的一序列之探針可互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*CGB*、*PARP1*、*FOXO3A*、*MED30*、*CCNE1*、*MYC*、*TFF1*、*FABP1*、*LAMP5*、*MATN3*、*CLIP4*、*NOX4*、*ADRA2C*、*CSK*、*FZD9*、*GALR1*、*GRM6*、*INSR*、*LPHN1*、*LYN*、*MRGPRX3*、*ADCY3*、*HDAC2*、*CFL1*、*NRP2*、*ANXA10*、*TFF2*、*CDCA5*、*NUSAP1*、及其之組合。

【0400】 此外，使用單離之生物樣本的目的是偵測存在於該樣本中的cfDNA。因此，樣本中的cfDNA可藉由以各種方式被單離及/或濃縮來使用。在一個實施例中，可使用對核酸具有強親和力的硝化纖維素膜。此外，在一個實施例中，帶正電材料可用於捕獲帶負電之cfDNA。帶正電材料可為奈米顆粒、奈米線、網狀物或帶正電過濾器，但不限於此。在「帶正電材料」的一個實施例中，其可為帶正電奈米結構或帶正電膜。

【0401】 在奈米結構的一個例子中，其可包含陽離子聚合物。陽離子聚合物的種類不受限制。陽離子聚合物的一個實施例可為聚乙烯亞胺(PEI)，而且可為陽離子分枝聚合物聚乙烯亞胺。

【0402】 此外，藉由混合標示有鏈黴抗生物素蛋白的奈米線與結合有生物素之PEI的溶液，陽離子分枝聚乙烯亞胺(陽離子分枝PEI)可進一步經由生物素-鏈黴抗生物素蛋白的相互作用來結合至該奈米線。結果是，具有陽離子聚合物聚乙烯亞胺結合至奈米結構表面的奈米結構(PEI/mPpy NW)之奈米顆粒可以高密度和不規則分佈被併入。

【0403】 該些奈米線可甚至在低濃度下以高效率成功地捕獲基因組DNA和cfDNA。特別是，由於奈米線的特性，例如用於與例如DNA之目標分子結合的大表面積和用於促進與DNA相互作用之經增強的移動性，所以有可能有效率地且有效地捕獲cfDNA。

【0404】 在此情況下，目標cfDNA係指待偵測的期望cfDNA。在本說明書中，cfDNA具有雙股。在此情況下，在cfDNA的一部分中，雙股可為退繞的。此外，cfDNA可衍生自胃癌細胞的基因。具體而言，cfDNA可包括在胃癌細胞中過度表現的核酸序列。在癌細胞中過度表現的核酸序列係指在特定癌細胞中過度表現的核酸序列，儘管其在正常細胞中具有適當的表現位準。

【0405】 具體而言，在癌細胞中過度表現的核酸序列的位準或參考(截止)可為當使用標記測量吸光度(光密度)時，OD值是0.010或更多的情況。

【0406】 更具體地，在癌細胞中過度表現的核酸序列的位準或參考中，藉由使用標記測量吸光度，OD值為約0.012或約0.015或更多。在此情況下，用於測量吸光度所照射的波長可根據標記來適當地決定。cfDNA可為DNA，其中雙股是退繞的(DNA之退繞)。此外，cfDNA可適當地根據目的來測定。

【0407】 此外，衍生自胃癌細胞之cfDNA的特徵可在於i)具有比起具有衍生自正常細胞的一雙螺旋結構之cfDNA所具者較低之Tm值，或ii)在具有衍生自正常細胞的一雙螺旋結構之該cfDNA不變性之一條件下變性。

【0408】 此外，該cfDNA能夠在下列條件中之任一者與可互補地結合至

cfDNA之約15聚體至約30聚體探針結合：i)在周遭溫度下靜置約1分鐘至約120分鐘的條件；ii)在約90 °C至約95 °C下加熱約1秒至約3分鐘的條件；iii)在約75 °C至約90 °C下加熱約1秒至約5分鐘的條件；iv)在約60 °C至約75 °C下加熱約30秒至約30分鐘的條件；v)在約25 °C至約40 °C下加熱約10分鐘至約120分鐘的條件；vi)以蛋白酶處理約1分鐘至約30分鐘的條件； vii)以DNase處理約1分鐘至約30分鐘的條件；及viii)以化學物質(例如氫氧化鈉、DMSO、表面活性劑等)處理的條件。

【0409】 在胃癌細胞中過度表現的基因可為選自由下列組成之群組中之任一者：*ACPP*(NCBI基因ID: 55)、*FLU3*(NCBI基因ID: 837968)、*CGB*(NCBI基因ID: 1082)、*KRT19*(NCBI基因ID: 3880)、*PARP1*(NCBI基因ID: 142)、*FOXO3A*(NCBI基因ID: 2309)、*MED30*(NCBI基因ID: 90390)、*ERBB2*(NCBI基因ID: 2064)、*CCNE1*(NCBI基因ID: 898)、*MYC*(NCBI基因ID: 4609)、*EGFR*(NCBI基因ID: 1956)、*KRAS*(NCBI基因ID: 3845)、*TFF1*(NCBI基因ID: 7031)、*FABP1*(NCBI基因ID: 2168)、*CK20*(NCBI基因ID: 54474)、*MUC2*(NCBI基因ID: 4583)、*SDC2*(NCBI基因ID: 6383)、*LAMP5*(NCBI基因ID: 24141)、*MATN3*(NCBI基因ID: 4148)、*CLIP4*(NCBI基因ID: 79745)、*NOX4*(NCBI基因ID: 50507)、*ADRA2C*(NCBI基因ID: 152)、*CSK*(NCBI基因ID: 1445)、*FZD9*(NCBI基因ID: 8326)、*GALR1*(NCBI基因ID: 2587)、*GRM6*(NCBI基因ID: 2916)、*INSR*(NCBI基因ID: 3643)、*LPHN1*(NCBI基因ID: 22859)、*LYN*(NCBI基因ID: 4067)、*MRGPRX3*(NCBI基因ID: 117195)、*ADCY3*(NCBI基因ID: 109)、*HDAC2*(NCBI基因ID: 3066)、*CFL1*(NCBI基因ID: 1072)、*COTL1*(NCBI基因ID: 23406)、*NRP2*(NCBI基因ID: 8828)、*ANXA10*(NCBI基因ID: 11199)、*TFF2*(NCBI基因ID: 7032)、*CDCA5*(NCBI基因ID: 113130)、*ATAD2*(NCBI基因ID: 29028)、*ASB9*(NCBI基因ID: 140462)、*MMP1*(NCBI基因ID: 4312)、*CEACAM6*(NCBI基因ID: 4680)、*DSCC1*(NCBI基因ID: 79075)、*CKS2*(NCBI基因ID: 1164)、CST1(NCBI基因ID: 1469)、*IFITM1*(NCBI基因ID: 8519)、

NUSAP1(NCBI基因ID: 51203)、*MELK*(NCBI基因ID: 9833)、*LGALS3BP*(NCBI基因ID: 3959)、*CPT1A*(NCBI基因ID: 1374)、*IFNG*(NCBI基因ID: 3458)、*CD274*(NCBI基因ID: 29126)、*FOLR1*(NCBI基因ID: 2348)、*EPCAM*(NCBI基因ID: 4072)、*CEACAM5*(NCBI基因ID: 1048)、及其之組合。

【0410】在一個實施例中，特異地存在於胃癌的基因可為*CGB*、*PARP1*、*FOXO3A*、*MED30*、*CCNE1*、*MYC*、*TFF1*、*FABP1*、*LAMP5*、*MATN3*、*CLIP4*、*NOX4*、*ADRA2C*、*CSK*、*FZD9*、*GALR1*、*GRM6*、*INSR*、*LPHN1*、*LYN*、*MRGPRX3*、*ADCY3*、*HDAC2*、*CFL1*、*NRP2*、*ANXA10*、*TFF2*、*CDCA5*、*NUSAP1*基因，另外地，可另外地偵測*ACPP*、*FLU3*、*KRT19*、*ERBB2*、*EGFR*、*KRAS*、*DSCC1*、*CK20*、*MUC2*、*SDC2*、*COTL1*、*ATAD2*、*ASB9*、*MMP1*、*CEACAM6*、*DSCC1*、*CKS2*、*CST1*、*IFITM1*、*MELK*、*LGALS3BP*、*CPT1A*、*IFNG*、*CD279*、*CD274*、*ERBB2*、*EGFR*、*FOLR1*或*EPCAM*基因，以診斷胃癌。

【0411】如本案所用，術語"*CGB*"係指編碼hCG (人類絨毛膜促性腺激素)激素的基因。一些癌症亦製造hCG激素。因此，假使患者未懷孕時測得的hCG激素位準是高的，則可診斷出癌症。

【0412】如本案所用，術語「探針」是指用於偵測cfDNA的DNA或RNA。探針可具有能夠互補地結合至cfDNA的特定序列。具有互補於cfDNA的序列的探針係指具有能夠互補地結合至存在於血漿中欲偵測之所欲雙股cfDNA的核酸序列的探針。在此情況下，探針可為結合有生物素之一者。探針可結合到一結合至生物素結合蛋白之標記。

【0413】如本案所用，術語「標記」是指用於偵測結合至cfDNA之探針的材料。標記可為奈米顆粒、螢光染料、螢光蛋白或酶。具體而言，標記可為選自由量子點、HRP與螢光蛋白組成之群組中之任一者。在一個實施例中，標記可為GFP (綠色螢光蛋白)、BFP(藍色螢光蛋白)、CFP (青色螢光蛋白)、YFP(黃色螢光

蛋白)或HRP (辣根過氧化酶)，但不限於此。

【0414】 標記可為結合有生物素結合蛋白之一者。生物素結合蛋白可為基於抗生物素蛋白之蛋白質、抗生物素蛋白、鏈黴抗生物素蛋白、或中性抗生物素蛋白(neutravidin)，但可不受限地使用，只要其是可特異地結合至生物素之蛋白質即可。在一個實施例中，標記可為結合有鏈黴抗生物素蛋白之一者。

【0415】 如本案所用，術語「鏈黴抗生物素蛋白」是單離自抗生物素鏈黴菌的具有約60 kDa之分子量的四聚體生物素結合蛋白。其與抗生物素蛋白具有極低的同源性，但其結構與抗生物素蛋白極為相似。如同抗生物素蛋白，其具有抗菌活性和對生物素的極高結合能力。另一方面，不同於抗生物素蛋白，其不含有碳水化合物、具有酸性等電點(pI = 5)，並具有比起抗生物素蛋白顯著較低的溶解度。市售的鏈黴抗生物素蛋白，例如Thermo Scientific的Pierce Streptavidin是鏈黴抗生物素蛋白的重組形式，具有約53 kDa的分子量且具有接近中性(PI = 6.8至7.5)的等電點。相較於抗生物素蛋白，具有缺乏糖基化和低PI的鏈黴抗生物素蛋白具有低位準之非特異性結合(特別是凝集素結合)。鏈黴抗生物素蛋白的該等性質使其被選作用於許多偵測系統的理想試劑。

【0416】 如本案所用，術語「崔特抗生物素蛋白」係指鏈黴抗生物素蛋白的突變體(變體或突變蛋白)，而且是具有對生物素約10倍較慢的解離速率是且具有增加的機械強度和增進的熱穩定性的蛋白質。此外，崔特抗生物素蛋白特異地結合至生物素。

【0417】 本發明的術語「中性抗生物素蛋白」也稱作「去糖基化抗生物素蛋白」且是為了避免天然存在的抗生物素蛋白和鏈黴抗生物素蛋白的主要缺點而製備的。如該名稱所示，中性抗生物素蛋白是將抗生物素蛋白去糖基化所製成的。其為具有降低的分子量(約60k Da)並維持相較於抗生物素蛋白之高度的生物素結合能力的蛋白質。抗生物素蛋白的去糖基化係將凝集素之結合減少至偵測

不到的位準，並降低等電點(pI = 約6.3)，以有效地消除非特異性結合至抗生物素蛋白的主要原因。離胺酸殘基仍然可用，所以其可容易地衍生化或複合，像是鏈黴抗生物素蛋白。此外，由於其展現出高度的生物素結合能力和低的非特異性結合，其可以各種方式用作理想的生物素結合蛋白。

【0418】 如本案所用，術語「偵測標記的步驟」係指偵測經由生物素-抗生物素蛋白的反應結合至探針的標記的步驟。標記的偵測可藉由顏色變化、UV吸光度變化、存在或不存在生物發光、螢光變化、或電化學變化來測量。具體而言，用於偵測標記的方法可取決於使用的標記來不同地執行。例如，當HRP用作標記時，該標記可藉由觀察經由過氧化氫與受質之間的反應的顏色反應來偵測。此外，當標記是例如GFP的螢光蛋白時，標記的存在或不存在可藉由觀察照射特定波長的光之後所偵測到的光來偵測。此外，當標記是螢光素酶時，該標記的存在可藉由生物冷光儀測量加入例如螢光素之受質之後所展現出的生物發光來偵測。

【0419】 此外，本發明的診斷方法可進一步包含使cfDNA變性的步驟。在此情況下，可進行變性步驟，以選擇性地僅使衍生自胃癌的cfDNA變性，而不使正常的雙股cfDNA變性。為此，變性步驟的條件可為在約50 °C至約100 °C下進行約0.1秒至約5分鐘。變性溫度的一個實施例可為約95 °C，變性時間可通常為約0.1秒至約8分鐘。此外，可被變性約1秒、約5秒、約10秒、約30秒、約60秒或約90秒。在一個實施例中，變性cfDNA的步驟可在上述步驟c)前執行。

【0420】 具體而言，該方法可進一步包含在上述步驟c)前，在下列條件中之任一者使結合至帶正電材料之樣本或cfDNA變性的一步驟：i)在周遭溫度下靜置約1分鐘至約10分鐘的條件；ii)在約90 °C至約95 °C下加熱1秒至1分鐘的條件；iii)在約75 °C至約90 °C下加熱約10秒至約3分鐘的條件；iv)在約60 °C至約75 °C下加熱約1分鐘至約30分鐘的條件；v)在約25 °C至約40 °C下加熱約5分鐘至約60

分鐘的條件；vi)以蛋白酶處理約1分鐘至約10分鐘的條件；vii)以DNase處理約1分鐘至約10分鐘的條件。此變性步驟並不使衍生自正常細胞的雙股cfDNA變性，而是選擇性地僅使衍生自癌細胞的cfDNA變性，藉此使其更容易與探針結合。變性條件i)至vii)可在獲取樣本之後進行。此外，變性條件i)至vii)可在獲取結合至帶正電材料的cfDNA之後進行。此外，變性條件i)至vii)的溫度、蛋白酶和DNase處理時間可適當地調整，只要其不使穩定cfDNA變性即可。

胃癌診斷套組

【0421】本發明的其他態樣提供了一種用於診斷胃癌的診斷套組，包含一結合有生物素的探針，該探針互補地結合至胃癌中特異地表現之一基因；一帶正電材料；結合有一基於抗生物素蛋白之蛋白質的一標記；及一手冊。

【0422】在此情況下，胃癌中特異地表現之基因可選自由下列組成之群組中之任一者或多者：*CGB*、*PARP1*、*FOXO3A*、*MED30*、*CCNE1*、*MYC*、*TFF1*、*FABP1*、*LAMP5*、*MATN3*、*CLIP4*、*NOX4*、*ADRA2C*、*CSK*、*FZD9*、*GALR1*、*GRM6*、*INSR*、*LPHN1*、*LYN*、*MRGPRX3*、*ADCY3*、*HDAC2*、*CFL1*、*NRP2*、*ANXA10*、*TFF2*、*CDCA5*、*NUSAP1*、及其之組合。

【0423】此外，該手冊可說明該套組係構設成能夠藉由下列流程來診斷胃癌：a)使用該套組內含的一帶正電材料來單離cfDNA，該cfDNA係來自單離自一個體之一生物樣本；b)在該單離之cfDNA中依序地或同時地混合該套組內含的一結合有生物素的探針與該套組內含的一標記；c)移除未結合至cfDNA之該探針與該標記；及d)偵測該標記的信號。

【0424】此外，其可進一步包含一結合有生物素的探針，該探針係互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*ACPP*、*FLU3*、*KRT19*、*ERBB2*、*EGFR*、*KRAS*、*DSCC1*、*CK20*、*MUC2*、*SDC2*、*COTL1*、*ATAD2*、*ASB9*、*MMP1*、*CEACAM6*、*DSCC1*、*CKS2*、*CST1*、*IFITM1*、*MELK*、*LGALS3BP*、*CPT1A*、*IFNG*、

CD279、*CD274*、*ERBB2*、*EGFR*、*FOLR1*、*EPCAM*、及其之組合。

【0425】 此外，探針、帶正電材料及標記係如上文所述。

胃癌診斷裝置

【0426】 本發明的其他態樣提供了一種用於診斷胃癌的裝置，其藉由在不擴增之下偵測衍生自來自一樣本的胃癌細胞之一基因，其中該裝置包含a)一混合部件，用於將單離自一個體之包含cfDNA的一生物樣本與一帶正電材料混合；b)一獲取部件，用於移除除結合有cfDNA之該帶正電材料外之該樣本；c)一反應部件，用於依序地或同時地將一結合有生物素之能夠互補地結合至胃癌中特異地表現之基因的探針；及包含鏈黴抗生物素蛋白與一標記的一奈米顆粒添加至結合有cfDNA之該帶正電材料；d)一偵測部件，用於偵測該標記；及e)一資訊處理部件，用於取決於是否偵測到該標記來判定該樣本中是否存在具有互補於該探針且衍生自胃癌的一序列之cfDNA。

【0427】 在此情況下，胃癌中特異地表現之基因可選自由下列組成之群組中之任一者或多者：*CGB*、*PARP1*、*FOXO3A*、*MED30*、*CCNE1*、*MYC*、*TFF1*、*FABP1*、*LAMP5*、*MATN3*、*CLIP4*、*NOX4*、*ADRA2C*、*CSK*、*FZD9*、*GALR1*、*GRM6*、*INSR*、*LPHN1*、*LYN*、*MRGPRX3*、*ADCY3*、*HDAC2*、*CFL1*、*NRP2*、*ANXA10*、*TFF2*、*CDCA5*、*NUSAP1*、及其之組合。

【0428】 此外，其可進一步包含一結合有生物素的探針，該探針係互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*ACPP*、*FLU3*、*KRT19*、*ERBB2*、*EGFR*、*KRAS*、*DSCC1*、*CK20*、*MUC2*、*SDC2*、*COTL1*、*ATAD2*、*ASB9*、*MMP1*、*CEACAM6*、*DSCC1*、*CKS2*、*CST1*、*IFITM1*、*MELK*、*LGALS3BP*、*CPT1A*、*IFNG*、*CD279*、*CD274*、*ERBB2*、*EGFR*、*FOLR1*、*EPCAM*、及其之組合。

<胰臟癌>

用於診斷胰臟癌的方法

【0429】 本發明之一態樣提供一種用於診斷胰臟癌的方法，其藉由在不擴增之下偵測衍生自來自一樣本的胰臟癌細胞之一基因，其中該方法包含a)將單離自一個體之包含游離DNA (下稱cfDNA)的一生物樣本與一帶正電材料混合的一步驟；b)單離結合有cfDNA之該帶正電材料的一步驟；c)在混合物中依序地或同時地混合具有互補於該cfDNA的一序列之一探針與一標記的一步驟；d)移除未結合至cfDNA之該探針與該標記的一步驟；及e)偵測該標記的一步驟，其中具有互補於cfDNA的一序列之該探針係互補地結合至已知為一胰臟癌生物標記之一基因。在此情況下，已知為胰臟癌生物標記的基因可為編碼胰臟癌中過度表現之蛋白質的基因。

【0430】 具體而言，具有互補於cfDNA的一序列之探針可互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*SMAD4*、*APC*、*GNAS*、及其之組合。

【0431】 此外，使用單離之生物樣本的目的是偵測存在於該樣本中的cfDNA。因此，樣本中的cfDNA可藉由以各種方式被單離及/或濃縮來使用。在一個實施例中，可使用對核酸具有強親和力的硝化纖維素膜。此外，在一個實施例中，帶正電材料可用於捕獲帶負電之cfDNA。帶正電材料可為奈米顆粒、奈米線、網狀物或帶正電過濾器，但不限於此。在「帶正電材料」的一個實施例中，其可為帶正電奈米結構或帶正電膜。

【0432】 在奈米結構的一個例子中，其可包含陽離子聚合物。陽離子聚合物的種類不受限制。陽離子聚合物的一個實施例可為聚乙烯亞胺(PEI)，而且可為陽離子分枝聚合物聚乙烯亞胺。

【0433】 此外，藉由混合標示有鏈黴抗生物素蛋白的奈米線與結合有生物素之PEI的溶液，陽離子分枝聚乙烯亞胺(陽離子分枝PEI)可進一步經由生物素-鏈黴抗生物素蛋白的相互作用來結合至該奈米線。結果是，具有陽離子聚合物聚乙烯亞胺結合至奈米結構表面的奈米結構(PEI/mPpy NW)之奈米顆粒可以高密

度和不規則分佈被併入。

【0434】該些奈米線可甚至在低濃度下以高效率成功地捕獲基因組DNA和cfDNA。特別是，由於奈米線的特性，例如用於與例如DNA之目標分子結合的大表面積和用於促進與DNA相互作用之經增強的移動性，所以有可能有效率地且有效地捕獲cfDNA。

【0435】在此情況下，目標cfDNA係指待偵測的期望cfDNA。在本說明書中，cfDNA具有雙股。在此情況下，在cfDNA的一部分中，雙股可為退繞的。此外，cfDNA可衍生自胰臟癌細胞的基因。具體而言，cfDNA可包括在胰臟癌細胞中過度表現的核酸序列。在癌細胞中過度表現的核酸序列係指在特定癌細胞中過度表現的核酸序列，儘管其在正常細胞中具有適當的表現位準。

【0436】具體而言，在癌細胞中過度表現的核酸序列的位準或參考(截止)可為當使用標記測量吸光度(光密度)時，OD值是0.010或更多的情況。

【0437】更具體地，在癌細胞中過度表現的核酸序列的位準或參考中，藉由使用標記測量吸光度，OD值為約0.012或約0.015或更多。在此情況下，用於測量吸光度所照射的波長可根據標記來適當地決定。cfDNA可為DNA，其中雙股是退繞的(DNA之退繞)。此外，cfDNA可適當地根據目的來測定。

【0438】此外，衍生自胰臟癌細胞之cfDNA的特徵可在於i)具有比起具有衍生自正常細胞的一雙螺旋結構之cfDNA所具者較低之Tm值，或ii)在具有衍生自正常細胞的一雙螺旋結構之該cfDNA不變性之一條件下變性。

【0439】此外，該cfDNA能夠在下列條件中之任一者與可互補地結合至cfDNA之約15聚體至約30聚體探針結合：i)在周遭溫度下靜置約1分鐘至約120分鐘的條件；ii)在約90 °C至約95 °C下加熱約1秒至約3分鐘的條件；iii)在約75 °C至約90 °C下加熱約1秒至約5分鐘的條件；iv)在約60 °C至約75 °C下加熱約30秒至約30分鐘的條件；v)在約25 °C至約40 °C下加熱約10分鐘至約120分鐘的條件；vi)

以蛋白酶處理約1分鐘至約30分鐘的條件；vii)以DNase處理約1分鐘至約30分鐘的條件；及viii)以化學物質(例如氫氧化鈉、DMSO、表面活性劑等)處理的條件。

【0440】 在胰臟癌細胞中過度表現的基因可為選自由下列組成之群組中之任一者： 3845)、*SMADA4*(NCBI基因ID: 4089)、*APC*(NCBI基因ID: 324)、*GNAS*(NCBI基因ID: 2788)、*MUC1*(NCBI基因ID: 4582)、*CEACAM5*(NCBI基因ID: 1048)、*CEACAM1*(NCBI基因ID: 634)、*MUC16*(NCBI基因ID: 94025)、及其之組合。

【0441】 在一個實施例中，特異地存在於胰臟癌的基因可為*SMAD4*、*APC*、*GNAS*基因，另外地，可另外地偵測*KRAS*、*MUC1*、*MSLN*、*CEACAM1*、*CEACAM5*或*MUC16*基因，以診斷胰臟癌。

【0442】 如本案所用，術語「探針」是指用於偵測cfDNA的DNA或RNA。探針可具有能夠互補地結合至cfDNA的特定序列。具有互補於cfDNA的序列的探針係指具有能夠互補地結合至存在於血漿中欲偵測之所欲雙股cfDNA的核酸序列的探針。在此情況下，探針可為結合有生物素之一者。探針可結合到一結合至生物素結合蛋白之標記。

【0443】 如本案所用，術語「標記」是指用於偵測結合至cfDNA之探針的材料。標記可為奈米顆粒、螢光染料、螢光蛋白或酶。具體而言，標記可為選自由量子點、HRP與螢光蛋白組成之群組中之任一者。在一個實施例中，標記可為GFP (綠色螢光蛋白)、BFP(藍色螢光蛋白)、CFP (青色螢光蛋白)、YFP(黃色螢光蛋白)或HRP (辣根過氧化酶)，但不限於此。

【0444】 標記可為結合有生物素結合蛋白之一者。生物素結合蛋白可為基於抗生物素蛋白之蛋白質、抗生物素蛋白、鏈黴抗生物素蛋白、或中性抗生物素蛋白(neutravidin)，但可不受限地使用，只要其是可特異地結合至生物素之蛋白質即可。在一個實施例中，標記可為結合有鏈黴抗生物素蛋白之一者。

【0445】 如本案所用，術語「鏈黴抗生物素蛋白」是單離自抗生物素鏈黴菌的具有約60 kDa之分子量的四聚體生物素結合蛋白。其與抗生物素蛋白具有極低的同源性，但其結構與抗生物素蛋白極為相似。如同抗生物素蛋白，其具有抗菌活性和對生物素的極高結合能力。另一方面，不同於抗生物素蛋白，其不含有碳水化合物、具有酸性等電點(pI = 5)，並具有比起抗生物素蛋白顯著較低的溶解度。市售的鏈黴抗生物素蛋白，例如Thermo Scientific的Pierce Streptavidin是鏈黴抗生物素蛋白的重組形式，具有約53 kDa的分子量且具有接近中性(PI = 6.8至7.5)的等電點。相較於抗生物素蛋白，具有缺乏糖基化和低PI的鏈黴抗生物素蛋白具有低位準之非特異性結合(特別是凝集素結合)。鏈黴抗生物素蛋白的該等性質使其被選作用於許多偵測系統的理想試劑。

【0446】 如本案所用，術語「崔特抗生物素蛋白」係指鏈黴抗生物素蛋白的突變體(變體或突變蛋白)，而且是具有對生物素約10倍較慢的解離速率是且具有增加的機械強度和增進的熱穩定性的蛋白質。此外，崔特抗生物素蛋白特異地結合至生物素。

【0447】 本發明的術語「中性抗生物素蛋白」也稱作「去糖基化抗生物素蛋白」且是為了避免天然存在的抗生物素蛋白和鏈黴抗生物素蛋白的主要缺點而製備的。如該名稱所示，中性抗生物素蛋白是將抗生物素蛋白去糖基化所製成的。其為具有降低的分子量(約60k Da)並維持相較於抗生物素蛋白之高度的生物素結合能力的蛋白質。抗生物素蛋白的去糖基化係將凝集素之結合減少至偵測不到的位準，並降低等電點(pI = 約6.3)，以有效地消除非特異性結合至抗生物素蛋白的主要原因。離胺酸殘基仍然可用，所以其可容易地衍生化或複合，像是鏈黴抗生物素蛋白。此外，由於其展現出高度的生物素結合能力和低的非特異性結合，其可以各種方式用作理想的生物素結合蛋白。

【0448】 如本案所用，術語「偵測標記的步驟」係指偵測經由生物素-抗生

物素蛋白的反應結合至探針的標記的步驟。標記的偵測可藉由顏色變化、UV吸光度變化、存在或不存在生物發光、螢光變化、或電化學變化來測量。具體而言，用於偵測標記的方法可取決於使用的標記來不同地執行。例如，當HRP用作標記時，該標記可藉由觀察經由過氧化氫與受質之間的反應的顏色反應來偵測。此外，當標記是例如GFP的螢光蛋白時，標記的存在或不存在可藉由觀察照射特定波長的光之後所偵測到的光來偵測。此外，當標記是螢光素酶時，該標記的存在可藉由生物冷光儀測量加入例如螢光素之受質之後所展現出的生物發光來偵測。

【0449】 此外，本發明的診斷方法可進一步包含使cfDNA變性的步驟。在此情況下，可進行變性步驟，以選擇性地僅使衍生自胰臟癌的cfDNA變性，而不使正常的雙股cfDNA變性。為此，變性步驟的條件可為在約50 °C至約100 °C下進行約0.1秒至約5分鐘。變性溫度的一個實施例可為約95 °C，變性時間可通常為約0.1秒至約8分鐘。此外，可被變性約1秒、約5秒、約10秒、約30秒、約60秒或約90秒。在一個實施例中，變性cfDNA的步驟可在上述步驟c)前執行。

【0450】 具體而言，該方法可進一步包含在上述步驟c)前，在下列條件中之任一者使結合至帶正電材料之樣本或cfDNA變性的一步驟：i)在周遭溫度下靜置約1分鐘至約10分鐘的條件；ii)在約90 °C至約95 °C下加熱1秒至1分鐘的條件；iii)在約75 °C至約90 °C下加熱約10秒至約3分鐘的條件；iv)在約60 °C至約75 °C下加熱約1分鐘至約30分鐘的條件；v)在約25 °C至約40 °C下加熱約5分鐘至約60分鐘的條件；vi)以蛋白酶處理約1分鐘至約10分鐘的條件；vii)以DNase處理約1分鐘至約10分鐘的條件。此變性步驟並不使衍生自正常細胞的雙股cfDNA變性，而是選擇性地僅使衍生自癌細胞的cfDNA變性，藉此使其更容易與探針結合。變性條件i)至vii)可在獲取樣本之後進行。此外，變性條件i)至vii)可在獲取結合至帶正電材料的cfDNA之後進行。此外，變性條件i)至vii)的溫度、蛋白酶和DNase處

理時間可適當地調整，只要其不使穩定cfDNA變性即可。

胰臟癌診斷套組

【0451】本發明的其他態樣提供了一種用於診斷胰臟癌的診斷套組，包含一結合有生物素的探針，該探針互補地結合至胰臟癌中特異地表現之一基因；一帶正電材料；結合有一基於抗生物素蛋白之蛋白質的一標記；及一手冊。

【0452】在此情況下，胰臟癌中特異地表現之基因可選自由下列組成之群組中之任一者或多者：*SMAD4*、*APC*、*GNAS*、及其之組合。

【0453】此外，該手冊可說明該套組係構設成能夠藉由下列流程來診斷胰臟癌：a)使用該套組內含的一帶正電材料來單離cfDNA，該cfDNA係來自單離自一個體之一生物樣本；b)在該單離之cfDNA中依序地或同時地混合該套組內含的一結合有生物素的探針與該套組內含的一標記；c)移除未結合至cfDNA之該探針與該標記；及d)偵測該標記的信號。

【0454】此外，其可進一步包含一結合有生物素的探針，該探針係互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*KRAS*、*MUC1*、*MSLN*、*CEACAM1*、*CEACAM5*與*MUC16*、及其之組合。

【0455】此外，探針、帶正電材料及標記係如上文所述。

胰臟癌診斷裝置

【0456】本發明的其他態樣提供了一種用於診斷胰臟癌的裝置，其藉由在不擴增之下偵測衍生自來自一樣本的胰臟癌細胞之一基因，其中該裝置包含a)一混合部件，用於將單離自一個體之包含cfDNA的一生物樣本與一帶正電材料混合；b)一獲取部件，用於移除除結合有cfDNA之該帶正電材料外之該樣本；c)一反應部件，用於依序地或同時地將一結合有生物素之能夠互補地結合至胰臟癌中特異地表現之基因的探針；及包含鏈黴抗生物素蛋白與一標記的一奈米顆粒添加至結合有cfDNA之該帶正電材料；d)一偵測部件，用於偵測該標記；及e)一

資訊處理部件，用於取決於是否偵測到該標記來判定該樣本中是否存在具有互補於該探針且衍生自胰臟癌的一序列之cfDNA。

【0457】 在此情況下，胰臟癌中特異地表現之基因可選自由下列組成之群組中之任一者或多者：*SMAD4*、*APC*、*GNAS*、及其之組合。

【0458】 此外，其可進一步包含一結合有生物素的探針，該探針係互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*KRAS*、*MUC1*、*MSLN*、*CEACAM1*、*CEACAM5*與*MUC16*、及其之組合。

<早期診斷和預後預測>

用於診斷癌症的方法

【0459】 本發明之一態樣提供一種用於早期診斷癌症或預測癌症預後的方法，其藉由在不擴增之下偵測衍生自來自一樣本的癌細胞之一基因，其中該方法包含a)將單離自一個體之包含游離DNA (下稱cfDNA)的一生物樣本與一帶正電材料混合的一步驟；b)單離結合有cfDNA之該帶正電材料的一步驟；c)在混合物中依序地或同時地混合具有互補於該cfDNA的一序列之一探針與一標記的一步驟；d)移除未結合至cfDNA之該探針與該標記的一步驟；及e)偵測該標記的一步驟，其中具有互補於cfDNA的一序列之該探針係互補地結合至已知為一癌症生物標記之一基因。

【0460】 具體而言，具有互補於cfDNA的一序列之探針可互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*CPT1A*、*IFNG*、*IFNGR1*、*CD279*、*CD274*、及其之組合。在此情況下，較佳地，選自上述群組之兩個或更多個基因可組合。

【0461】 癌症可為選自由下列組成之群組中之任一者：肺癌、大腸直腸癌、前列腺癌、甲狀腺癌、乳癌、腦癌、頭頸癌、食道癌、皮膚癌、胸腺癌、胃癌、大腸癌、肝癌、卵巢癌、子宮癌、膀胱癌、直腸癌、膽囊癌、膽管癌、胰臟癌、

淋巴瘤、急性白血病、多發性骨髓瘤、及其之組合。

【0462】此外，使用單離之生物樣本的目的是偵測存在於該樣本中的cfDNA。因此，樣本中的cfDNA可藉由以各種方式被單離及/或濃縮來使用。在一個實施例中，可使用對核酸具有強親和力的硝化纖維素膜。此外，在一個實施例中，帶正電材料可用於捕獲帶負電之cfDNA。帶正電材料可為奈米顆粒、奈米線、網狀物或帶正電過濾器，但不限於此。在「帶正電材料」的一個實施例中，其可為帶正電奈米結構或帶正電膜。

【0463】在奈米結構的一個例子中，其可包含陽離子聚合物。陽離子聚合物的種類不受限制。陽離子聚合物的一個實施例可為聚乙烯亞胺(PEI)，而且可為陽離子分枝聚合物聚乙烯亞胺。

【0464】此外，藉由混合標示有鏈黴抗生物素蛋白的奈米線與結合有生物素之PEI的溶液，陽離子分枝聚乙烯亞胺(陽離子分枝PEI)可進一步經由生物素-鏈黴抗生物素蛋白的相互作用來結合至該奈米線。結果是，具有陽離子聚合物聚乙烯亞胺結合至奈米結構表面的奈米結構(PEI/mPpy NW)之奈米顆粒可以高密度和不規則分佈被併入。

【0465】該些奈米線可甚至在低濃度下以高效率成功地捕獲基因組DNA和cfDNA。特別是，由於奈米線的特性，例如用於與例如DNA之目標分子結合的大表面積和用於促進與DNA相互作用之經增強的移動性，所以有可能有效率地且有效地捕獲cfDNA。

【0466】在此情況下，目標cfDNA係指待偵測的期望cfDNA。在本說明書中，cfDNA具有雙股。在此情況下，在cfDNA的一部分中，雙股可為退繞的。此外，cfDNA可衍生自癌細胞的基因。具體而言，cfDNA可包括在癌細胞中過度表現的核酸序列。在癌細胞中過度表現的核酸序列係指在特定癌細胞中過度表現的核酸序列，儘管其在正常細胞中具有適當的表現位準。

【0467】 具體而言，在癌細胞中過度表現的核酸序列的位準或參考(截止)可為當使用標記測量吸光度(光密度)時，OD值是0.010或更多的情況。更具體地，在癌細胞中過度表現的核酸序列的位準或參考中，藉由使用標記測量吸光度，OD值可為約0.012或約0.015或更多。在此情況下，用於測量吸光度所照射的波長可根據標記來適當地決定。cfDNA可為DNA，其中雙股是退繞的(DNA之退繞)。此外，cfDNA可適當地根據目的來測定。

【0468】 此外，衍生自癌細胞之cfDNA的特徵可在於i)具有比起具有衍生自正常細胞的一雙螺旋結構之cfDNA所具者較低之Tm值，或ii)在具有衍生自正常細胞的一雙螺旋結構之該cfDNA不變性之一條件下變性。

【0469】 此外，該cfDNA能夠在下列條件中之任一者與可互補地結合至cfDNA之約15聚體至約30聚體探針結合：i)在周遭溫度下靜置約1分鐘至約120分鐘的條件；ii)在約90 °C至約95 °C下加熱約1秒至約3分鐘的條件；iii)在約75 °C至約90 °C下加熱約1秒至約5分鐘的條件；iv)在約60 °C至約75 °C下加熱約30秒至約30分鐘的條件；v)在約25 °C至約40 °C下加熱約10分鐘至約120分鐘的條件；vi)以蛋白酶處理約1分鐘至約30分鐘的條件；vii)以DNase處理約1分鐘至約30分鐘的條件；及viii)以化學物質(例如氫氧化鈉、DMSO、表面活性劑等)處理的條件。

【0470】 在癌細胞中過度表現的基因可為選自由下列組成之群組中之任一者：*FNG* (NCBI基因ID: 3458)、*IFNGR1* (NCBI基因ID: 3459)、*CD279* (NCBI基因ID: 5133)與*CD274* (NCBI基因ID: 29126)、及其之組合。在一個實施例中，當癌細胞中過度表現的兩個基因經組合時，該組合可為IFNG/ IFNGR1、IFNG/CD274或IFNG/CD279。在一個實施例中，當癌細胞中過度表現的三個基因經組合時，該組合可為IFNG/IFNGR1/CD274、IFNG/CD274/CD279或IFNGR1/CD274/CD279。在一個實施例中，當癌細胞中過度表現的四個基因經組合時，該組合可為INFG/IFNGR1/CD274/CD279。當癌細胞中過度表現的兩個或

更多個基因經分析時，分析結果的可靠性可增強。

【0471】 如本案所用，術語"IFNG"係指編碼丙型干擾素的基因。

【0472】 如本案所用，術語"*IFNGR1*"係指編碼丙型干擾素受體1的基因。

【0473】 如本案所用，術語"*CD274*"係指編碼PD-L1 (程式死亡-配體1)的基因。

【0474】 如本案所用，術語「探針」是指用於偵測cfDNA的DNA或RNA。探針可具有能夠互補地結合至cfDNA的特定序列。具有互補於cfDNA的序列的探針係指具有能夠互補地結合至存在於血漿中欲偵測之所欲雙股cfDNA的核酸序列的探針。在此情況下，探針可為結合有生物素之一者。探針可結合到一結合至生物素結合蛋白之標記。

【0475】 如本案所用，術語「標記」是指用於偵測結合至cfDNA之探針的材料。標記可為奈米顆粒、螢光染料、螢光蛋白或酶。具體而言，標記可為選自由量子點、HRP與螢光蛋白組成之群組中之任一者。在一個實施例中，標記可為GFP (綠色螢光蛋白)、BFP(藍色螢光蛋白)、CFP (青色螢光蛋白)、YFP(黃色螢光蛋白)或HRP (辣根過氧化酶)，但不限於此。

【0476】 標記可為結合有生物素結合蛋白之一者。生物素結合蛋白可為基於抗生物素蛋白之蛋白質、抗生物素蛋白、鏈黴抗生物素蛋白、或中性抗生物素蛋白(neutravidin)，但可不受限地使用，只要其是可特異地結合至生物素之蛋白質即可。在一個實施例中，標記可為結合有鏈黴抗生物素蛋白之一者。

【0477】 如本案所用，術語「鏈黴抗生物素蛋白」是單離自抗生物素鏈黴菌的具有約60 kDa之分子量的四聚體生物素結合蛋白。其與抗生物素蛋白具有極低的同源性，但其結構與抗生物素蛋白極為相似。如同抗生物素蛋白，其具有抗菌活性和對生物素的極高結合能力。另一方面，不同於抗生物素蛋白，其不含有碳水化合物、具有酸性等電點(pI = 5)，並具有比起抗生物素蛋白顯著較低的

溶解度。市售的鏈黴抗生物素蛋白，例如Thermo Scientific的Pierce Streptavidin是鏈黴抗生物素蛋白的重組形式，具有約53 kDa的分子量且具有接近中性(PI = 6.8至7.5)的等電點。相較於抗生物素蛋白，具有缺乏糖基化和低PI的鏈黴抗生物素蛋白具有低位準之非特異性結合(特別是凝集素結合)。鏈黴抗生物素蛋白的該等性質使其被選作用於許多偵測系統的理想試劑。

【0478】 如本案所用，術語「崔特抗生物素蛋白」係指鏈黴抗生物素蛋白的突變體(變體或突變蛋白)，而且是具有對生物素約10倍較慢的解離速率是且具有增加的機械強度和增進的熱穩定性的蛋白質。此外，崔特抗生物素蛋白特異地結合至生物素。

【0479】 本發明的術語「中性抗生物素蛋白」也稱作「去糖基化抗生物素蛋白」且是為了避免天然存在的抗生物素蛋白和鏈黴抗生物素蛋白的主要缺點而製備的。如該名稱所示，中性抗生物素蛋白是將抗生物素蛋白去糖基化所製成的。其為具有降低的分子量(約60k Da)並維持相較於抗生物素蛋白之高度的生物素結合能力的蛋白質。抗生物素蛋白的去糖基化係將凝集素之結合減少至偵測不到的位準，並降低等電點(pI = 約6.3)，以有效地消除非特異性結合至抗生物素蛋白的主要原因。離胺酸殘基仍然可用，所以其可容易地衍生化或複合，像是鏈黴抗生物素蛋白。此外，由於其展現出高度的生物素結合能力和低的非特異性結合，其可以各種方式用作理想的生物素結合蛋白。

【0480】 如本案所用，術語「偵測標記的步驟」係指偵測經由生物素-抗生物素蛋白的反應結合至探針的標記的步驟。標記的偵測可藉由顏色變化、UV吸光度變化、存在或不存在生物發光、螢光變化、或電化學變化來測量。具體而言，用於偵測標記的方法可取決於使用的標記來不同地執行。例如，當HRP用作標記時，該標記可藉由觀察經由過氧化氫與受質之間的反應的顏色反應來偵測。此外，當標記是例如GFP的螢光蛋白時，標記的存在或不存在可藉由觀察照射特定

波長的光之後所偵測到的光來偵測。此外，當標記是螢光素酶時，該標記的存在可藉由生物冷光儀測量加入例如螢光素之受質之後所展現出的生物發光來偵測。

【0481】 此外，本發明的診斷方法可進一步包含使cfDNA變性的步驟。在此情況下，可進行變性步驟，以選擇性地僅使衍生自癌症的cfDNA變性，而不使正常的雙股cfDNA變性。為此，變性步驟的條件可為在約50 °C至約100 °C下進行約0.1秒至約5分鐘。變性溫度的一個實施例可為約95 °C，變性時間可通常為約0.1秒至約8分鐘。此外，可被變性約1秒、約5秒、約10秒、約30秒、約60秒或約90秒。在一個實施例中，變性cfDNA的步驟可在上述步驟c)前執行。

【0482】 具體而言，該方法可進一步包含在上述步驟c)前，在下列條件中之任一者使結合至帶正電材料之樣本或cfDNA變性的一步驟：i)在周遭溫度下靜置約1分鐘至約10分鐘的條件；ii)在約90 °C至約95 °C下加熱1秒至1分鐘的條件；iii)在約75 °C至約90 °C下加熱約10秒至約3分鐘的條件；iv)在約60 °C至約75 °C下加熱約1分鐘至約30分鐘的條件；v)在約25 °C至約40 °C下加熱約5分鐘至約60分鐘的條件；vi)以蛋白酶處理約1分鐘至約10分鐘的條件；vii)以DNase處理約1分鐘至約10分鐘的條件。此變性步驟並不使衍生自正常細胞的雙股cfDNA變性，而是選擇性地僅使衍生自癌細胞的cfDNA變性，藉此使其更容易與探針結合。變性條件i)至vii)可在獲取樣本之後進行。此外，變性條件i)至vii)可在獲取結合至帶正電材料的cfDNA之後進行。此外，變性條件i)至vii)的溫度、蛋白酶和DNase處理時間可適當地調整，只要其不使穩定cfDNA變性即可。

癌症診斷套組

【0483】 本發明的其他態樣提供了一種用於早期診斷癌症或預測癌症預後的診斷套組，包含一結合有生物素的探針，該探針互補地結合至癌症中特異地表現之一基因；一帶正電材料；結合有一基於抗生物素蛋白之蛋白質的一標記；及

一手冊。

【0484】 在此情況下，癌症中特異地表現之基因可選自由下列組成之群組中之任一者或多者：*CPT1A*、*IFNG*、*IFNGR1*、*CD279*、*CD274*、及其之組合。

【0485】 此外，該手冊可說明該套組係構設成能夠藉由下列流程來早期診斷癌症或預測癌症預後：a)使用該套組內含的一帶正電材料來單離cfDNA，該cfDNA係來自單離自一個體之一生物樣本；b)在該單離之cfDNA中依序地或同時地混合該套組內含的一結合有生物素的探針與該套組內含的一標記；c)移除未結合至cfDNA之該探針與該標記；及d)偵測該標記的信號。

【0486】 此外，探針、帶正電材料及標記係如上文所述。

癌症診斷裝置

【0487】 本發明的其他態樣提供了一種用於早期診斷癌症或預測癌症預後的裝置，其藉由在不擴增之下偵測衍生自來自一樣本的癌細胞之一基因，其中該裝置包含a)一混合部件，用於將單離自一個體之包含cfDNA的一生物樣本與一帶正電材料混合；b)一獲取部件，用於移除除結合有cfDNA之該帶正電材料外之該樣本；c)一反應部件，用於依序地或同時地將一結合有生物素之能夠互補地結合至癌症中特異地表現之基因的探針；及包含鏈黴抗生物素蛋白與一標記的一奈米顆粒添加至結合有cfDNA之該帶正電材料；d)一偵測部件，用於偵測該標記；及e)一資訊處理部件，用於取決於是否偵測到該標記來判定該樣本中是否存在具有互補於該探針且衍生自癌症的一序列之cfDNA。

【0488】 在此情況下，癌症中特異地表現之基因可選自由下列組成之群組中之任一者或多者：*CPT1A*、*IFNG*、*IFNGR1*、*CD279*、*CD274*、及其之組合。

<癌症>

用於確認癌症、癌症轉移和癌症對藥物之抗性的方法

【0489】 本發明之一態樣提供一種用於判定存在或不存在癌症、癌症轉移

狀態及/或抗性的方法，其藉由在不擴增之下偵測衍生自來自一樣本的癌細胞之一基因，其中該方法包含a)將單離自一個體之包含游離DNA (下稱cfDNA)的一生物樣本與一帶正電材料混合的一步驟；b)單離結合有cfDNA之該帶正電材料的一步驟；c)在混合物中依序地或同時地混合具有互補於該cfDNA的一序列之一探針與一標記的一步驟；d)移除未結合至cfDNA之該探針與該標記的一步驟；及e)偵測該標記的一步驟，其中該cfDNA衍生自癌細胞，且具有互補於cfDNA的一序列之該探針係互補地結合至已知為癌症與癌症轉移或抗性生物標記存在或不存在的一指標之一基因，該方法係判定存在或不存在癌症的轉移狀態或抗性。在此情況下，已知為存在或不存在癌症和癌症轉移或抗性之生物標記的指標的基因可為包括癌症的單核苷酸多型性(SNP)的基因(參見範例6和範例7)。

【0490】 具體而言，具有互補於cfDNA的一序列之探針可互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*CPT1A*、*IFNG*、*IFNGR1*、*CD279*、*CD274*、及其之組合。

【0491】 具有互補於cfDNA的一序列之探針可互補地結合至癌細胞中過度表現的基因，特別是特異地存在於癌症的基因、與轉移相關的基因或與抗藥性相關的基因。

【0492】 在一個實施例中，癌細胞中過度表現的基因可為選自由下列組成之群組中之任一者：*CPT1A*、*IFNG*、*IFNGR1*、*CD279*、*CD274*、*NSE*、*SCC*、*CEA*、*cyfra21-1*、*TPA*、*NMP22*、*OGT*、*甲狀腺球蛋白(TG)*、*抑鈣素(CALCA)*、*BRAF V600E*、*TERT C228T/C250T*、*AFP*、*β-HCG(CGB)*、*CA19-9*、*PSA*、*PSMA*、*PAP*、*PCA3*、*TMPRSS2-ERG*、*CA125*、*HIF-1a*、*VEGF*、*CA15-3*、*HER2*、*SCC(SART3)*、*TOP2A*、*MCM2*、*p16INK4a(CDKN2A)*、*Ki-67(MKI167)*、*HE4(WEDC2)*、及其之組合。

【0493】 在一個實施例中，特異地存在於癌症的基因可為*CPT1A*、*IFNG*、*IFNGR1*、*CD279*、*CD274*基因，另外地，可另外地偵測*NSE*、*SCC*、*CEA*、*cyfra21-*

*1、TPA、NMP22、OGT、甲狀腺球蛋白(TG)、抑鈣素(CALCA)、BRAF V600E、TERT C228T/C250T、AFP、β-HCG(CGB)、CA19-9、PSA、PSMA、PAP、PCA3、TMPRSS2-ERG、CA125、HIF-1a、VEGF、CA15-3、HER2、SCC(SART3)、TOP2A、MCM2、p16INK4a(CDKN2A)、Ki-67(MKI167)*或*HE4(WEDC2)*基因，以診斷癌症。

【0494】在一個實施例中，與癌症轉移相關的基因可為與「增生」和「侵入」相關的基因，並可為例如Ki67、STK15、存活素(Survivin)、週期蛋白B1 (Cyclin B1)、MYBL2、溶基質素3 (Stromelysin3)或細胞自溶酶L2 (Cathepsin L2)。

【0495】在一個實施例中，與抗藥性相關的基因可取決於藥物和癌症的類型來判定。在一個實施例中，與EGFR-TKI之後天抗性相關的基因可為選自由下列組成之群組中之任一者：EGFR T790M、PI3K、BRAF、MAPK1、HER2、KRAS、NRAS、RB缺失、p53缺失、PTEN與NFkB。

【0496】此外，使用單離之生物樣本的目的是偵測存在於該樣本中的cfDNA。因此，樣本中的cfDNA可藉由以各種方式被單離及/或濃縮來使用。在一個實施例中，可使用對核酸具有強親和力的硝化纖維素膜。此外，在一個實施例中，帶正電材料可用於捕獲帶負電之cfDNA。帶正電材料可為奈米顆粒、奈米線、網狀物或帶正電過濾器，但不限於此。在「帶正電材料」的一個實施例中，其可為帶正電奈米結構或帶正電膜。

【0497】在奈米結構的一個例子中，其可包含陽離子聚合物。陽離子聚合物的種類不受限制。陽離子聚合物的一個實施例可為聚乙烯亞胺(PEI)，而且可為陽離子分枝聚合物聚乙烯亞胺。

【0498】此外，藉由混合標示有鏈黴抗生物素蛋白的奈米線與結合有生物素之PEI的溶液，陽離子分枝聚乙烯亞胺(陽離子分枝PEI)可進一步經由生物素-鏈黴抗生物素蛋白的相互作用來結合至該奈米線。結果是，具有陽離子聚合物聚乙烯亞胺結合至奈米結構表面的奈米結構(PEI/mPpy NW)之奈米顆粒可以高密

度和不規則分佈被併入。

【0499】該些奈米線可甚至在低濃度下以高效率成功地捕獲基因組DNA和cfDNA。特別是，由於奈米線的特性，例如用於與例如DNA之目標分子結合的大表面積和用於促進與DNA相互作用之經增強的移動性，所以有可能有效率地且有效地捕獲cfDNA。

【0500】在此情況下，目標cfDNA係指待偵測的期望cfDNA。在本說明書中，cfDNA具有雙股。在此情況下，在cfDNA的一部分中，雙股可為退繞的。此外，cfDNA可衍生自癌細胞的基因。具體而言，cfDNA可包括在癌細胞中過度表現的核酸序列。在癌細胞中過度表現的核酸序列係指在特定癌細胞中過度表現的核酸序列，儘管其在正常細胞中具有適當的表現位準。

【0501】具體而言，在癌細胞中過度表現的核酸序列的位準或參考(截止)可為當使用標記測量吸光度(光密度)時，OD值是0.010或更多的情況。更具體地，在癌細胞中過度表現的核酸序列的位準或參考中，藉由使用標記測量吸光度，OD值為約0.012或約0.015或更多。在此情況下，用於測量吸光度所照射的波長可根據標記來適當地決定。cfDNA可為DNA，其中雙股是退繞的(DNA之退繞)。此外，cfDNA可適當地根據目的來測定。

【0502】此外，衍生自癌細胞之cfDNA的特徵可在於i)具有比起具有衍生自正常細胞的一雙螺旋結構之cfDNA所具者較低之Tm值，或ii)在具有衍生自正常細胞的一雙螺旋結構之該cfDNA不變性之一條件下變性。

【0503】此外，該cfDNA能夠在下列條件中之任一者與可互補地結合至cfDNA之約15聚體至約30聚體探針結合：i)在周遭溫度下靜置約1分鐘至約120分鐘的條件；ii)在約90 °C至約95 °C下加熱約1秒至約3分鐘的條件；iii)在約75 °C至約90 °C下加熱約1秒至約5分鐘的條件；iv)在約60 °C至約75 °C下加熱約30秒至約30分鐘的條件；v)在約25 °C至約40 °C下加熱約10分鐘至約120分鐘的條件；vi)

以蛋白酶處理約1分鐘至約30分鐘的條件；vii)以DNase處理約1分鐘至約30分鐘的條件；及viii)以化學物質(例如氫氧化鈉、DMSO、表面活性劑等)處理的條件。

【0504】如本案所用，術語「探針」是指用於偵測cfDNA的DNA或RNA。探針可具有能夠互補地結合至cfDNA的特定序列。具有互補於cfDNA的序列的探針係指具有能夠互補地結合至存在於血漿中欲偵測之所欲雙股cfDNA的核酸序列的探針。在此情況下，探針可為結合有生物素之一者。探針可結合到一結合至生物素結合蛋白之標記。

【0505】如本案所用，術語「標記」是指用於偵測結合至cfDNA之探針的材料。標記可為奈米顆粒、螢光染料、螢光蛋白或酶。具體而言，標記可為選自由量子點、HRP與螢光蛋白組成之群組中之任一者。在一個實施例中，標記可為GFP (綠色螢光蛋白)、BFP(藍色螢光蛋白)、CFP (青色螢光蛋白)、YFP(黃色螢光蛋白)或HRP (辣根過氧化酶)，但不限於此。

【0506】標記可為結合有生物素結合蛋白之一者。生物素結合蛋白可為基於抗生物素蛋白之蛋白質、抗生物素蛋白、鏈黴抗生物素蛋白、或中性抗生物素蛋白(neutravidin)，但可不受限地使用，只要其是可特異地結合至生物素之蛋白質即可。在一個實施例中，標記可為結合有鏈黴抗生物素蛋白之一者。

【0507】如本案所用，術語「鏈黴抗生物素蛋白」是單離自抗生物素鏈黴菌的具有約60 kDa之分子量的四聚體生物素結合蛋白。其與抗生物素蛋白具有極低的同源性，但其結構與抗生物素蛋白極為相似。如同抗生物素蛋白，其具有抗菌活性和對生物素的極高結合能力。另一方面，不同於抗生物素蛋白，其不含有碳水化合物、具有酸性等電點(pI = 5)，並具有比起抗生物素蛋白顯著較低的溶解度。市售的鏈黴抗生物素蛋白，例如Thermo Scientific的Pierce Streptavidin是鏈黴抗生物素蛋白的重組形式，具有約53 kDa的分子量且具有接近中性(PI = 6.8至7.5)的等電點。相較於抗生物素蛋白，具有缺乏糖基化和低PI的鏈黴抗生物素

蛋白具有低位準之非特異性結合(特別是凝集素結合)。鏈黴抗生物素蛋白的該等性質使其被選作用於許多偵測系統的理想試劑。

【0508】 如本案所用，術語「崔特抗生物素蛋白」係指鏈黴抗生物素蛋白的突變體(變體或突變蛋白)，而且是具有對生物素約10倍較慢的解離速率是且具有增加的機械強度和增進的熱穩定性的蛋白質。此外，崔特抗生物素蛋白特異地結合至生物素。

【0509】 本發明的術語「中性抗生物素蛋白」也稱作「去糖基化抗生物素蛋白」且是為了避免天然存在的抗生物素蛋白和鏈黴抗生物素蛋白的主要缺點而製備的。如該名稱所示，中性抗生物素蛋白是將抗生物素蛋白去糖基化所製成的。其為具有降低的分子量(約60k Da)並維持相較於抗生物素蛋白之高度的生物素結合能力的蛋白質。抗生物素蛋白的去糖基化係將凝集素之結合減少至偵測不到的位準，並降低等電點(pI = 約6.3)，以有效地消除非特異性結合至抗生物素蛋白的主要原因。離胺酸殘基仍然可用，所以其可容易地衍生化或複合，像是鏈黴抗生物素蛋白。此外，由於其展現出高度的生物素結合能力和低的非特異性結合，其可以各種方式用作理想的生物素結合蛋白。

【0510】 如本案所用，術語「偵測標記的步驟」係指偵測經由生物素-抗生物素蛋白的反應結合至探針的標記的步驟。標記的偵測可藉由顏色變化、UV吸光度變化、存在或不存在生物發光、螢光變化、或電化學變化來測量。具體而言，用於偵測標記的方法可取決於使用的標記來不同地執行。例如，當HRP用作標記時，該標記可藉由觀察經由過氧化氫與受質之間的反應的顏色反應來偵測。此外，當標記是例如GFP的螢光蛋白時，標記的存在或不存在可藉由觀察照射特定波長的光之後所偵測到的光來偵測。此外，當標記是螢光素酶時，該標記的存在可藉由生物冷光儀測量加入例如螢光素之受質之後所展現出的生物發光來偵測。

【0511】 此外，本發明的診斷方法可進一步包含使cfDNA變性的步驟。在此情況下，可進行變性步驟，以選擇性地僅使衍生自癌症的cfDNA變性，而不使正常的雙股cfDNA變性。為此，變性步驟的條件可為在約50 °C至約100 °C下進行約0.1秒至約5分鐘。變性溫度的一個實施例可為約95 °C，變性時間可通常為約0.1秒至約8分鐘。此外，可被變性約1秒、約5秒、約10秒、約30秒、約60秒或約90秒。在一個實施例中，變性cfDNA的步驟可在上述步驟c)前執行。

【0512】 具體而言，該方法可進一步包含在上述步驟c)前，在下列條件中之任一者使結合至帶正電材料之樣本或cfDNA變性的一步驟：i)在周遭溫度下靜置約1分鐘至約10分鐘的條件；ii)在約90 °C至約95 °C下加熱1秒至1分鐘的條件；iii)在約75 °C至約90 °C下加熱約10秒至約3分鐘的條件；iv)在約60 °C至約75 °C下加熱約1分鐘至約30分鐘的條件；v)在約25 °C至約40 °C下加熱約5分鐘至約60分鐘的條件；vi)以蛋白酶處理約1分鐘至約10分鐘的條件；vii)以DNase處理約1分鐘至約10分鐘的條件。此變性步驟並不使衍生自正常細胞的雙股cfDNA變性，而是選擇性地僅使衍生自癌細胞的cfDNA變性，藉此使其更容易與探針結合。變性條件i)至vii)可在獲取樣本之後進行。此外，變性條件i)至vii)可在獲取結合至帶正電材料的cfDNA之後進行。此外，變性條件i)至vii)的溫度、蛋白酶和DNase處理時間可適當地調整，只要其不使穩定cfDNA變性即可。

癌症診斷套組

【0513】 本發明的其他態樣提供了一種用於診斷癌症的診斷套組，包含一結合有生物素的探針，該探針互補地結合至癌症中特異地表現之一基因；一帶正電材料；結合有一基於抗生物素蛋白之蛋白質的一標記；及一手冊。

【0514】 在此情況下，癌症中特異地表現之基因可選自由下列組成之群組中之任一者或多者：*CPT1A*、*IFNG*、*IFNGR1*、*CD279*、*CD274G*、及其之組合。

【0515】 此外，該手冊可說明該套組係構設成能夠藉由下列流程來診斷癌

症：a)使用該套組內含的一帶正電材料來單離cfDNA，該cfDNA係來自單離自一個體之一生物樣本；b)在該單離之cfDNA中依序地或同時地混合該套組內含的一結合有生物素的探針與該套組內含的一標記；c)移除未結合至cfDNA之該探針與該標記；及d)偵測該標記的信號。

【0516】 此外，其可進一步包含一結合有生物素的探針，該探針係互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*NSE*、*SCC*、*CEA*、*cyfra21-1*、*TPA*、*NMP22*、*OGT*、*甲狀腺球蛋白(TG)*、*抑鈣素(CALCA)*、*BRAF V600E*、*TERT C228T/C250T*、*AFP*、*β-HCG(CGB)*、*CA19-9*、*PSA*、*PSMA*、*PAP*、*PCA3*、*TMPRSS2-ERG*、*CA125*、*HIF-1a*、*VEGF*、*CA15-3*、*HER2*、*SCC(SART3)*、*TOP2A*、*MCM2*、*p16INK4a(CDKN2A)*、*Ki-67(MKI167)*、*HE4(WEDC2)*、及其之組合。

【0517】 此外，探針、帶正電材料及標記係如上文所述。

癌症診斷裝置

【0518】 本發明的其他態樣提供了一種用於診斷癌症的裝置，其藉由在不擴增之下偵測衍生自來自一樣本的癌細胞之一基因，其中該裝置包含a)一混合部件，用於將單離自一個體之包含cfDNA的一生物樣本與一帶正電材料混合；b)一獲取部件，用於移除除結合有cfDNA之該帶正電材料外之該樣本；c)一反應部件，用於依序地或同時地將一結合有生物素之能夠互補地結合至癌症中特異地表現之基因的探針；及包含鏈黴抗生物素蛋白與一標記的一奈米顆粒添加至結合有cfDNA之該帶正電材料；d)一偵測部件，用於偵測該標記；及e)一資訊處理部件，用於取決於是否偵測到該標記來判定該樣本中是否存在具有互補於該探針且衍生自癌症的一序列之cfDNA。

【0519】 在此情況下，癌症中特異地表現之基因可選自由下列組成之群組中之任一者或多者：*CPT1A*、*IFNG*、*IFNGR1*、*CD279*、*CD274*、及其之組合。

【0520】 此外，其可進一步包含一結合有生物素的探針，該探針係互補地

結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*NSE*、*SCC*、*CEA*、*cyfra21-1*、*TPA*、*NMP22*、*OGT*、*甲狀腺球蛋白(TG)*、*抑鈣素(CALCA)*、*BRAF V600E*、*TERT C228T/C250T*、*AFP*、*β-HCG(CGB)*、*CA19-9*、*PSA*、*PSMA*、*PAP*、*PCA3*、*TMPRSS2-ERG*、*CA125*、*HIF-1a*、*VEGF*、*CA15-3*、*HER2*、*SCC(SART3)*、*TOP2A*、*MCM2*、*p16INK4a(CDKN2A)*、*Ki-67(MKI167)*、*HE4(WEDC2)*、及其之組合。

執行發明的模式

【0521】 下文，將經由以下工作範例更詳細地說明本發明。然而，提供下列範例僅用於例示本發明之目的，但本發明之範疇不限於下列範例。

實驗方法

1. 用於偵測衍生自腫瘤特異性基因之cfDNA的方法

步驟1: 樣本製備和奈米線添加

【0522】 在獲取患者的血漿、尿液、唾液、痰或類似物後，立即將其在4 °C以3000xg離心，持續10分鐘。將患者的血漿、尿液、唾液、痰或類似物以給定比例稀釋在DPBS中。在血漿的情況下，將1 μL或30 μL血漿在150 μL DW中混合並放入旋轉管柱(G型或Q型)，加入PEI/Ppy奈米線(150 μL)並在室溫下使用熱混合器以1,200 rpm的速度混合，持續20分鐘。

步驟2: 真空/洗滌/溫度變性

【0523】 將旋轉管柱安裝在真空抽氣裝置上，然後於550 mBar進行抽氣。加入400 μL的1X DPBS，再次進行抽氣。再一次重複同樣的過程。僅有經由2個步驟之步驟獲得的奈米線-DNA複合物在旋轉管柱中被捕獲。當需要溫度變性時，將已完成抽氣的旋轉管柱放入預熱至95 °C的加熱塊中，並於95 °C培育1分鐘，然後立即取出。不需要溫度變性步驟的樣本不經歷此過程。

【0524】 圖85顯示使用不含磁性奈米顆粒之奈米線經由旋轉管柱分離cfDNA (圖85)。上方圖片是離心前的旋轉管柱的SEM影像，下方圖片是離心後已

分離出cfDNA的旋轉管柱的SEM影像。

步驟3: 添加探針與HRP/STR NPs

【0525】 將與實驗相容的探針(200 μL)和HRP/STR NPs溶液(200 μL)分別加至旋轉管柱。使用熱混合器在室溫下以850 rpm至1,000 rpm的速度混合，持續30分鐘。將旋轉管柱安裝在真空抽氣裝置上，然後進行抽氣。加入400 μL的1X DPBS，再次進行抽氣。再一次重複同樣的過程。

步驟4: 用於偵測基因突變的TMB反應

【0526】 將收集管置換成新的收集管之後，使用注射幫浦依序將200 μL乙酸鈉緩衝液(0.2 M, pH 7.0)、50 μL的H2O2 (0.1 M)加至旋轉管柱，然後進行培育，持續3分鐘。在培育結束時，將旋轉管柱以3,500 rpm至5,000 rpm的速度離心30秒。將收集管中收集的200 μL溶液移至96孔之各個孔，然後使用UV/VIS分光光度計在500 nm至850 nm的波長範圍內測量吸光度。

偵測方法的概述

【0527】 本發明的偵測步驟例示於圖84a至85g。圖84a顯示用於在獲得來自病患體液的cfDNA之後，使用具有聚乙烯亞胺(PEI)結合至奈米線表面之聚吡咯奈米線(PEI/Ppy NWs)經由與互補結合至目標cfDNA之探針和HRP/鏈黴抗生物素蛋白-奈米顆粒(HRP/st-帶標NP)的反應在約60分鐘內分析衍生自癌細胞之cfDNA的基因之方法的示意圖。圖84b是顯示使用奈米線、探針和HRP/鏈黴抗生物素蛋白奈米顆粒偵測衍生自癌細胞之cfDNA之方法的示意圖(圖84b)。圖84c是顯示使用奈米線經由旋轉管柱偵測衍生自癌細胞之基因的過程的圖(圖84c)。此外，在本發明的一個實施例中，可進一步包括經裂解緩衝液處理的步驟。圖84d顯示用於在例如血液、腦脊髓液或肋膜積液之樣本中偵測衍生自癌細胞之cfDNA之方法的時序流程圖(圖84d)。圖84e顯示用於在例如尿液之樣本中偵測衍生自癌細胞之cfDNA之方法的時序流程圖(圖84e)。圖84f是顯示根據取自血液的

cfDNA狀態之若干變性條件的差異的示意圖(圖84f)。圖84g是顯示根據取自尿液、唾液與痰的cfDNA狀態之若干變性條件的差異的示意圖(圖84g)。

製備例1.表面經陽離子聚合物處理之奈米線的製備

【0528】 如圖1a所示，製備了具有陽離子聚合物聚乙烯亞胺(PEI)共軛至奈米線表面之奈米線。陽極氧化鋁(AAO)的一個表面係使用Q150T模組化塗覆系統(Quorum Technologies, UK)以5×10^{-3} mbar與50 mA塗覆金(Au)層(厚度約150 nm)，持續600秒。所有的電化學實驗皆藉由使用配有鉑線相對電極與Ag/AgCl (3.0 M NaCl型)參考電極的恆電位儀/恆電流儀(BioLogic SP-150)在塗覆有金(Au)之AAO模板測量。

【0529】 為了連同0.01 M聚(4-苯乙烯磺酸)和含有1 mg/ml生物素的0.01 M吡咯溶液製備表面經陽離子聚合物處理之奈米線(PEI/Ppy NWs)，將計時電流法以1.0 V (vs. Ag/AgCl)施用至AAO模板的孔中，持續7分鐘，以進行電化學沉積。

【0530】 將所得AAO模板用蒸餾水洗滌數次，浸於2M氫氧化鈉(NaOH)溶液中，持續3小時，然後放進用於超音波處理的Bioruptor UCD-200 (Diagenode)中，以獲得摻雜有生物素分子的自立式聚(吡咯)奈米線(自立式Ppy NWs)。然後，將30 mM的N-(3-二甲基胺基丙基)-N-乙基碳二亞胺氫氯酸鹽(EDC)和6 mM的N-羥基琥珀醯亞胺(NHS)加至所得奈米線，以活化羧酸基(-COOH)。之後，加入PEI溶液，然後在周遭溫度下反應1小時，並用水洗滌，以獲得表面上共軛有聚乙烯亞胺之奈米結構(PEI/Ppy NW)。使獲得的奈米結構(PEI/Ppy NW)分散於去離子水中並於室溫儲存直到使用。

【0531】 經由此類製備方法，在AAO模板被選擇性溶解後，聚(吡咯) (Ppy)奈米線之各者從AAO模板脫離，陽離子分枝聚乙烯亞胺(陽離子分枝PEI，25 kDa)係經由生物素-鏈黴抗生物素蛋白相互作用來另外地共軛至奈米線。

製備例2.表面經陽離子聚合物處理之奈米線的製備

【0532】 根據與以上製備例1實質相同的方法，獲得具有聚離胺酸而非聚乙烯亞胺共軛至奈米結構表面之奈米結構(PL/Ppy NW)。

製備例3.經HRP和鏈黴抗生物素蛋白標示的聚(吡咯)奈米顆粒的製備

【0533】 為了製備結合有HRP和鏈黴抗生物素蛋白的奈米顆粒，將0.5 g聚乙烯吡咯烷酮(PVP)加至12.5 mL三次蒸餾水(tertiary distilled water)，攪拌30分鐘，然後添加65 μL吡咯，再攪拌10分鐘。之後，添加0.5 mL濃度為0.75 g/mL的$FeCl_3$溶液並反應3小時。之後，添加20 mL玻尿酸水溶液(400 mg/20 mL)，攪拌3小時，以製備聚(吡咯)-玻尿酸奈米顆粒(Ppy-HA-NPs)。

【0534】 MWCO: 在三次蒸餾水中使用50,000孔洞尺寸的膜進行透析，持續兩天。在1,200 rpm下離心3分鐘來移除大尺寸顆粒聚集體，然後冷凍乾燥。將以上製備的200 μg的Ppy-HA-NPs加至1 mL三次蒸餾水，然後添加100 mM EDC/50 mM NHS溶液並反應45分鐘，以活化玻尿酸的羧基。在以15,000 rpm離心10分鐘移除上清液的同時，進行兩次洗滌。將1 mg的HRP和1 mg的鏈黴抗生物素蛋白加至Ppy-HA-NPs並在4 °C溫度下混合。之後，藉由以15,000 rpm離心10分鐘，移除上清液，然後儲存在三次蒸餾水中。使用掃描電子顯微鏡觀察到具有HRP與鏈黴抗生物素蛋白共軛至奈米顆粒表面之奈米顆粒(HRP/st-帶標NP)的組態(圖1b)。

製備例4.探針構築

【0535】 探針係經構築以偵測具有不穩定雙螺旋結構的cfDNA。探針構築體係取決於待偵測的預期癌症類型的cfDNA而不同地構築。在此情況下，生物素係結合至探針。 取決於待診斷癌症的種類，探針的特定核酸序列資訊係如表1、5、9和11至28所示。

I.確認衍生自癌細胞株之基因的偵測準確性

範例1.偵測在癌細胞株中表現的基因

範例1.1.確認PD-L1的偵測準確性

【0536】 PD-L1偵測的準確性是使用取自ATCC和韓國細胞株銀行之已知為PD-L1陽性癌細胞株的MDA-MB-231、HCC827、H1975、PC9與H460癌細胞株以及已知為PD-L1陰性癌細胞株的A549、MDA-MB-468、HeLa與MCF7癌細胞株來確認。在此情況下，PD-L1陽性癌細胞株和PD-L1陰性癌細胞株係基於由CCLE (癌細胞株百科全書)提供的各個癌細胞株的PD-L1的mRNA位準來分類。

【0537】 具體而言，將基因組DNA從該PD-L1陽性癌細胞株和PD-L1陰性癌細胞株的各者提取出來，接著藉由超音波處理，以產生fDNA (碎片化DNA)。將50 ng/μL fDNA加至PBS，然後加入製備例1製備的奈米線並反應20分鐘，以單離彼等。之後，在95 °C的溫度下經歷溫度變性過程1分鐘，然後加入生物素化PD-L1探針，再反應20分鐘。在此情況下，所使用的探針顯示於下表1。

【表1】

	序列(5'->3')	序列ID號.
生物素化PD-L1探針1(外顯子5)	TGGGAGCCATCTTATTATGCC	1
生物素化PD-L1探針2(外顯子5)	CGGAAGATGAATGTCAGTGC	2
生物素化PD-L1探針3(外顯子2)	CCTACTGGCATTTGCTGAACG	3
生物素化PD-L1探針4(外顯子3)	ACCATAGCTGATCATGCAGCG	4

【0538】 為了比色偵測，以TMB (3,3',5,5'-四甲基聯苯胺)和H_2O_2加至乙酸鈉緩衝液的溶液處理，以確認偵測結果。分析各個癌細胞株的基於DNA的PD-L1表現(ΔOD)的結果是，在兩個重複實驗中，僅在MDA-MB-231、HCC827、H1975、PC9與H460癌細胞株的fDNA中觀察到清楚的PD-L1 DNA表現(ΔOD；截止OD > 0.012)。另一方面，在兩個重複實驗中，在A549、MDA-MB-461、HeLa與MCF7癌細胞株中未觀察到PD-L1 DNA表現(圖4和圖5)。此外，將各個癌細胞株的PD-L1 DNA表現結果和取自CCLE (癌細胞株百科全書)的各個癌細胞株的PD-L1 (CD274) mRNA表現結果比對。各個癌細胞株的PD-L1 (CD274) mRNA值顯示於

下表2。

【表2】

癌細胞株	CD274
MDAMB231_BREAST	3.474506
HCC827_LUNG	3.426417
NCIH1975_LUNG	2.513606
PC9_LUNG	1.098854
NCIH460_LUNG	0.903786
A549_LUNG	0.735843
MDAMB468_BREAST	-0.38864
MCF7_BREAST	-4.06132

【0539】結果是，MDA-MB-231、HCC827、H1975、PC9與H460癌細胞株中顯示高度的mRNA表現。另一方面，A549、MDA-MB-461、HeLa與MCF7癌細胞株中幾乎沒有顯示mRNA表現。

範例1.2.確認EpCAM的偵測準確性

【0540】EpCAM偵測的準確性是使用取自ATCC和韓國細胞株銀行之已知為EpCAM陽性癌細胞株的MDA-MB468、HCC827、MCF7、H1975與MDA-MB-231癌細胞株以及已知為EpCAM陰性癌細胞株的A549、H460與HeLa癌細胞株來確認。在此情況下，EpCAM陽性癌細胞株和EpCAM陰性癌細胞株係基於由CCLE(癌細胞株百科全書)提供的各個癌細胞株的EpCAM的mRNA位準來分類。

【0541】具體而言，將基因組DNA從該EpCAM陽性癌細胞株和EpCAM陰性癌細胞株的各者提取出來，接著藉由超音波處理，以產生fDNA。將50 ng/μL fDNA加至PBS，然後加入製備例1製備的奈米線並反應20分鐘，以單離彼等。之後，在95 °C的溫度下經歷溫度變性過程1分鐘，然後加入生物素化EpCAM探針，再反應20分鐘。在此情況下，所使用的探針顯示於下表3。

【表3】

	序列(5'->3')	序列ID號.
生物素化EpCAM探針1(外顯子1)	ACAGAGCGCTAGTCCTTCGGC	5

生物素化EpCAM探針2(外顯子4)	AACCTTATGATAGTAAAAGTT	6
生物素化EpCAM探針3(外顯子7)	GGTCTAAAAGCTGGTGTTATT	7
生物素化EpCAM探針4(外顯子9)	GAAACTGGCTTTACCAATCTT	8

【0542】 為了比色偵測，以TMB (3,3',5,5'-四甲基聯苯胺)和H_2O_2加至乙酸鈉緩衝液的溶液處理，以確認偵測結果。分析各個癌細胞株的基於DNA的EpCAM表現(ΔOD)的結果是，在兩個重複實驗中，僅在PC9、MDA-MB468、HCC827、MCF7、H1975與MDA-MB-231癌細胞株的fDNA中觀察到清楚的EpCAM DNA表現(ΔOD；截止OD > 0.012)。另一方面，在兩個重複實驗中，在H460與HeLa癌細胞株中未觀察到EpCAM DNA表現(圖6和圖7)。此外，將各個癌細胞株的EpCAM DNA表現結果和取自CCLE (癌細胞株百科全書)的各個癌細胞株的EpCAM mRNA表現結果比對。各個癌細胞株的EpCAM mRNA值顯示於下表4。

【表4】

基因	EpCAM
MDAMB468_BREAST	7.391754
HCC827_LUNG	7.394143
MCF7_BREAST	7.506349
NCIH1975_LUNG	6.241641
MDAMB231_BREAST	3.334
A549_LUNG	1.727828
NCIH460_LUNG	-0.448733
HRLA_CERVIX	-0.00781

【0543】 結果是，PC9、MDA-MB468、HCC827、MCF7、H1975與MDA-MB-231癌細胞株中顯示高度的mRNA表現。另一方面，H460與HeLa癌細胞株中幾乎沒有顯示mRNA表現。

範例1.3.確認FOLR1的偵測準確性

【0544】 FOLR1偵測的準確性是使用取自ATCC和韓國細胞株銀行之已知為FOLR1陽性癌細胞株的HeLa、MDA-MB-468、HCC827、MCF7與MDA-MB-231癌細胞株以及已知為FOLR1陰性癌細胞株的H460、PC9、H1975與A549癌細胞株

來確認。在此情況下，FOLR1陽性癌細胞株和FOLR1陰性癌細胞株係基於由CCLE (癌細胞株百科全書)提供的各個癌細胞株的FOLR1的mRNA位準來分類。

【0545】 具體而言，將基因組DNA從該FOLR1陽性癌細胞株和FOLR1陰性癌細胞株的各者提取出來，接著藉由超音波處理，以產生fDNA。將50 ng/μL fDNA加至PBS，然後加入製備例1製備的奈米線並反應20分鐘，以單離彼等。之後，在95 °C的溫度下經歷溫度變性過程1分鐘，然後加入生物素化FOLR1探針，再反應20分鐘。在此情況下，所使用的探針顯示於下表5。

【表5】

	序列(5'->3')	序列ID號.
生物素化FOLR1探針1(外顯子4)	TGTTCTACCAACACCAGCCAG	9
生物素化FOLR1探針2(外顯子2)	ACTGAACCCAAAGGATCACCT	10
生物素化FOLR1探針3(外顯子1)	CCTAGGCCACTAAACCACAGC	11
生物素化FOLR1探針4(外顯子5)	GGCTGGGCCCTGGGCAGCCTG	12

【0546】 為了比色偵測，以TMB (3,3',5,5'-四甲基聯苯胺)和H_2O_2加至乙酸鈉緩衝液的溶液處理，以確認偵測結果。分析各個癌細胞株的基於DNA的FOLR1表現(ΔOD)的結果是，在兩個重複實驗中，僅在HeLa、MDA-MB468、HCC827、MCF7與MDA-MB-231癌細胞株的fDNA中觀察到清楚的FOLR1 DNA表現(ΔOD；截止OD > 0.012)。另一方面，在兩個重複實驗中，在H460、PC9、H1975與A549癌細胞株中未觀察到FOLR1 DNA表現(圖8和圖9)。此外，將各個癌細胞株的FOLR1 DNA表現結果和取自CCLE (癌細胞株百科全書)的各個癌細胞株的FOLR1 mRNA表現結果比對。各個癌細胞株FOLR1 mRNA值顯示於下表6。

【表6】

癌細胞株	FOLR1
NCIH460_LUNG	-4.67303
A549_LUNG	-2.67569

NCIH1975_LUNG	-2.1258
PC9_LUNG	-1.3628
MDAMB231_BREAST	0.92787
MDAMB468_BREAST	1.029144
MCF7_BREAST	1.137905
HCC827_LUNG	2.13759
HRLA_CERVIX	6.756305

【0547】結果是，在HeLa、MDA-MB-468、HCC827、MCF7與MDA-MB-231癌細胞株中顯示高度mRNA表現。另一方面，在H460、PC9、H1975與A549癌細胞株中幾乎未顯示mRNA表現。

範例1.4.確認EGFR的偵測準確性

【0548】EGFR偵測的準確性是使用取自ATCC和韓國細胞株銀行之已知為EGFR陽性癌細胞株的HeLa、PC9、A549、H1975、H460、MDA-MB-468、MCF7與MDA-MB-231癌細胞株以及已知為EGFR陰性癌細胞株的MCF7癌細胞株來確認。在此情況下，EGFR陽性癌細胞株和EGFR陰性癌細胞株係基於由CCLE (癌細胞株百科全書)提供的各個癌細胞株的EGFR的mRNA位準來分類。

【0549】具體而言，將基因組DNA從該EGFR陽性癌細胞株和EGFR陰性癌細胞株的各者提取出來，接著藉由超音波處理，以產生fDNA。將50 ng/μL fDNA加至PBS，然後加入製備例1製備的奈米線並反應20分鐘，以單離彼等。之後，在95 °C的溫度下經歷溫度變性過程1分鐘，然後加入生物素化EGFR探針，再反應20分鐘。在此情況下，所使用的探針顯示於下表7。

【表7】

	序列(5'->3')	序列ID號.
生物素化EGFR探針1(外顯子1)	AACGCCACAACCACCGCGCAC	13
生物素化EGFR探針2(外顯子21)	GGACCGTCGCTTGGTGCACCG	14
生物素化EGFR探針3(外顯子19)	TCTGGACCCAGAAGGTGAGAA	15
生物素化EGFR探針4(外顯子20)	TGCTGGGCATCTGCCTCACCT	16

【0550】 為了比色偵測，以TMB (3,3',5,5'-四甲基聯苯胺)和H_2O_2加至乙酸鈉緩衝液的溶液處理，以確認偵測結果。分析各個癌細胞株的基於DNA的EGFR表現(ΔOD)的結果是，在兩個重複實驗中，僅在HCC827、PC9、MDA-MB468、MCF7與MDA-MB-231癌細胞株的fDNA中觀察到清楚的EGFR DNA表現(ΔOD；截止OD > 0.012)。另一方面，在兩個重複實驗中，在MCF7癌細胞株中未觀察到EGFR DNA表現(圖10和圖11)。此外，將各個癌細胞株的EGFR DNA表現結果和取自CCLE (癌細胞株百科全書)的各個癌細胞株的EGFR mRNA表現結果比對。各個癌細胞株的EGFR mRNA值顯示於下表8。

【表8】

基因	EGFR
MCF7_BREAST	-2.6082
NCIH460_LUNG	2.290725
HRLA_CERVIX	3.548315
NCIH1975_LUNG	4.722316
A549_LUNG	4.772873
MDAMB231_BREAST	5.060244
PC9_LUNG	6.4006
MDAMB468_BREAST	8.505156
HCC827_LUNG	8.98461

【0551】 結果是，HeLa、H460、PC9、H1975、MDA-MB-468、MCF7與MDA-MB-231癌細胞株中顯示高度的mRNA表現。另一方面，MCF7癌細胞株中幾乎沒有顯示mRNA表現。

範例1.5.確認ERBB2(HER2)的偵測準確性

【0552】 ERBB2偵測的準確性是使用取自ATCC和韓國細胞株銀行之已知為ERBB2陽性癌細胞株的MCF7、PC9、A549、H1975、H460、MDA-MB-468、MCF7與MDA-MB-231癌細胞株以及已知為ERBB2陰性癌細胞株的H460癌細胞株來確認。在此情況下，ERBB2陽性癌細胞株和ERBB2陰性癌細胞株係基於由CCLE (癌細胞株百科全書)提供的各個癌細胞株的ERBB2的mRNA位準來分類。

【0553】 具體而言，將基因組DNA從該ERBB2陽性癌細胞株和ERBB2陰性癌細胞株的各者提取出來，接著藉由超音波處理，以產生fDNA。將50 ng/μL fDNA加至PBS，然後加入製備例1製備的奈米線並反應20分鐘，以單離彼等。之後，在95 °C的溫度下經歷溫度變性過程1分鐘，然後加入生物素化ERBB2探針，再反應20分鐘。在此情況下，所使用的探針顯示於下表9。

【表9】

	序列(5'->3')	序列ID號.
生物素化ERBB2探針1(外顯子1)	TCGCAGCACCCCGCGCCCCGC	17
生物素化ERBB2探針2(外顯子5)	CCTGTTCTCCGATGTGTAAGG	18
生物素化ERBB2探針3(外顯子10)	CCGCTCCAGCCAGAGCAGCTC	19
生物素化ERBB2探針4(外顯子17)	AAGATCCGGAAGTACACGATG	20

【0554】 為了比色偵測，以TMB (3,3',5,5'-四甲基聯苯胺)和H_2O_2加至乙酸鈉緩衝液的溶液處理，以確認偵測結果。分析各個癌細胞株的基於DNA的ERBB2表現(ΔOD)的結果是，在兩個重複實驗中，僅在MCF7、PC9、A549、H1975、MDA-MB468、MCF7與MDA-MB-231癌細胞株的fDNA中觀察到清楚的ERBB2 DNA表現(ΔOD；截止OD > 0.010)。另一方面，在兩個重複實驗中，H460癌細胞株中未觀察到ERBB2 DNA表現(圖12和圖13)。此外，將各個癌細胞株的ERBB2 DNA表現結果和取自CCLE (癌細胞株百科全書)的各個癌細胞株的ERBB2 mRNA表現結果比對。各個癌細胞株ERBB2 mRNA值顯示於下表10。

【表10】

基因	ERBB2
MCF7_BREAST	4.64588
NCIH1975_LUNG	4.314726
HRLA_CERVIX	4.056006
HCC827_LUNG	4.077482
MDAMB231_BREAST	3.681573
MDAMB468_BREAST	3.576987

A549_LUNG	3.298639
NCIH460_LUNG	2.948514

【0555】 結果是，MCF7、PC9、A549、H1975、MDA-MB468、MCF7、H460與MDA-MB-231癌細胞株中顯示高度的mRNA表現。

範例1.6.確認OGT(O-連結型ß-N-乙醯基葡萄糖胺轉移酶)的偵測準確性

【0556】 OGT偵測的準確性是使用取自ATCC和韓國細胞株銀行之已知為OGT陽性癌細胞株的UMUC3、KU19-19、253J、J82、T24、MBT2癌細胞株以及已知為OGT陰性癌細胞株的RT4、MDCK、HBL EpC、Jurkat癌細胞株來確認。在此情況下，OGT陽性癌細胞株和OGT陰性癌細胞株係基於由CCLE (癌細胞株百科全書)提供的各個癌細胞株的OGT的mRNA位準來分類。

【0557】 具體而言，將基因組DNA從該OGT陽性癌細胞株和OGT陰性癌細胞株的各者提取出來，接著藉由超音波處理，以產生fDNA。將50 ng/μL fDNA加至PBS，然後加入製備例1製備的奈米線並反應20分鐘，以單離彼等。之後，在95 °C的溫度下經歷溫度變性過程1分鐘，然後加入生物素化OGT探針，再反應20分鐘。在此情況下，所使用的探針顯示於下表11。

【表11】

	序列(5'->3')	序列ID號.
生物素化OGT(O-GlcNAc轉移酶)探針1	ATGGCGTCTTCCGTGGGC	21
OGT_R生物素化OGT(O-GlcNAc轉移酶)探針2	TGCCCTGTGGCCATGGAC	22

【0558】 為了比色偵測，以TMB (3,3',5,5'-四甲基聯苯胺)和H_2O_2加至乙酸鈉緩衝液的溶液處理，以確認偵測結果。在以製備例1製備的奈米線偵測從OGT陽性癌細胞株和OGT陰性癌細胞株提取的fDNA後，分析各個癌細胞株的基於DNA的OGT表現(ΔOD)的結果是，在兩個重複實驗中，僅在UMUC3、KU19-19、253J、J82、T24、MBT2癌細胞株的fDNA中觀察到清楚的OGT DNA表現(ΔOD；截止OD > 0.010)。另一方面，在兩個重複實驗中，皆未在陽性膀胱癌細胞株RT4、以及正

常膀胱細胞株MDCK與HBL_EpC、或Jurkat T-淋巴球細胞中觀察到OGT DNA表現(圖14和圖15)。

II. I.衍生自癌細胞株之基因的腫瘤標記偵測

範例2.衍生自癌細胞株之生物標記的偵測

範例2.1.CEA的偵測

【0559】 CEA是使用取自ATCC和韓國細胞株銀行之已知為CEA陽性癌細胞株的LoVo、MKN45與SW1116癌細胞株以及已知為CEA陰性癌細胞株的HCT8、HCT15、HeLa與MDA-MB-231癌細胞株來偵測。在此情況下，CEA陽性癌細胞株和CEA陰性癌細胞株係基於由CCLE (癌細胞株百科全書)提供的各個癌細胞株的CEA的mRNA位準來分類。

【0560】 具體而言，將基因組DNA從該CEA陽性癌細胞株和CEA陰性癌細胞株的各者提取出來，接著藉由超音波處理，以產生fDNA。將50 ng/μL fDNA加至PBS，然後加入製備例1製備的奈米線並反應20分鐘，以單離彼等。之後，在95 °C的溫度下經歷溫度變性過程1分鐘，然後加入生物素化CEA探針，再反應20分鐘。在此情況下，所使用的探針顯示於下表12。

【表12】

	序列(5'->3')	序列ID號.
生物素化CEA(前列腺酸性磷酸酶；ACPP基因)探針1	AATCTGAACCTCTCCTGCCAC	23
生物素化CEA(前列腺酸性磷酸酶；ACPP基因)探針2	ACCCTTCATCACCAGCAACAA	24
生物素化CEA(前列腺酸性磷酸酶；ACPP基因)探針3	TATTCTTGGCTGATTGATGGG	25
生物素化CEA(前列腺酸性磷酸酶；ACPP基因)探針4	CAGCAACAACTCCAAACCCGT	26

【0561】 為了比色偵測，以TMB (3,3',5,5'-四甲基聯苯胺)和H_2O_2加至乙酸鈉緩衝液的溶液處理，以確認偵測結果。分析各個癌細胞株的基於DNA的CEA表

現(ΔOD)的結果是，在三個重複實驗中，僅在LoVo、MKN45與SW1116癌細胞株的fDNA中觀察到清楚的CEA DNA表現(ΔOD；截止OD > 0.010)。另一方面，在三個重複實驗中，在HCT8、HCT15、HeLa與MDA-MB-231癌細胞株中未觀察到CEA DNA表現(圖16至圖18)。

範例2.2.PSA的偵測

【0562】 PSA是使用取自ATCC和韓國細胞株銀行之已知為PSA陽性癌細胞株的LNE與LNCaP癌細胞株以及已知為PSA陰性癌細胞株的PC3、DU145與MCF7癌細胞株來偵測。在此情況下，PSA陽性癌細胞株和PSA陰性癌細胞株係基於由CCLE (癌細胞株百科全書)提供的各個癌細胞株的PSA的mRNA位準來分類。

【0563】 具體而言，將基因組DNA從該PSA陽性癌細胞株和PSA陰性癌細胞株的各者提取出來，接著藉由超音波處理，以產生fDNA。將50 ng/μL fDNA加至PBS，然後加入製備例1製備的奈米線並反應20分鐘，以單離彼等。之後，在95 °C的溫度下經歷溫度變性過程1分鐘，然後加入生物素化PSA探針，再反應20分鐘。在此情況下，所使用的探針顯示於下表13。

【表13】

	序列(5'->3')	序列ID號.
生物素化PSA(KLK3)探針1	CAGTCTGCGGCGGTGTTCTGG	27
生物素化PSA(KLK3)探針2	GCAAGTTCACCCTCAGAAGGT	28
生物素化PSA(KLK3)探針3	GAGGTCCAGGGTTGCTAGGAA	29

【0564】 為了比色偵測，以TMB (3,3',5,5'-四甲基聯苯胺)和H_2O_2加至乙酸鈉緩衝液的溶液處理，以確認偵測結果。分析各個癌細胞株的基於DNA的PSA表現(ΔOD)的結果是，在兩個重複實驗中，僅在LNE與LNCaP癌細胞株的fDNA中觀察到清楚的PSA DNA表現(ΔOD；截止OD > 0.010)。另一方面，在兩個重複實驗

中，在PC3、DU145與MCF7癌細胞株中未觀察到PSA DNA表現(圖19和圖20)。

範例2.3.CA19-9的偵測

【0565】 CA19-9是使用取自ATCC和韓國細胞株銀行之已知為CA19-9陽性癌細胞株的Capan1、Capn2與AsPC1癌細胞株以及已知為CA19-9陰性癌細胞株的MIA-PaCa2與Panc1癌細胞株來偵測。在此情況下，CA19-9陽性癌細胞株和CA19-9陰性癌細胞株係基於由CCLE (癌細胞株百科全書)提供的各個癌細胞株的CA19-9的mRNA位準來分類。

【0566】 具體而言，將基因組DNA從該CA19-9陽性癌細胞株和CA19-9陰性癌細胞株的各者提取出來，接著藉由超音波處理，以產生fDNA。將50 ng/μL fDNA加至PBS，然後加入奈米線並反應20分鐘，以單離彼等。之後，在95 °C的溫度下經歷溫度變性過程1分鐘，然後加入生物素化CA19-9探針，再反應20分鐘。在此情況下，所使用的探針顯示於下表14。

【表14】

	序列(5'->3')	序列ID號.
生物素化CA19-9(FLU3基因)探針1	GATCATCACGGCACGGTC	30
生物素化CA19-9(FLU3基因)探針2	GTGCAGAGAGATCATCACGGC	31
生物素化CA19-9(FLU3基因)探針3	TCTCTCTTACCTGGGACCTCA	32

【0567】 為了比色偵測，以TMB (3,3',5,5'-四甲基聯苯胺)和H_2O_2加至乙酸鈉緩衝液的溶液處理，以確認偵測結果。分析各個癌細胞株的基於DNA的CA19-9表現(ΔOD)的結果是，在兩個重複實驗中，僅在Capan1、Capn2與AsPC1癌細胞株的fDNA中觀察到清楚的CA19-9 DNA表現(ΔOD；截止OD > 0.010)。另一方面，在兩個重複實驗中，MIA-PaCa2與Panc1癌細胞株中未觀察到CA19-9 DNA表現(圖21和圖22)。

範例2.4.CA125的偵測

【0568】 CA125是使用取自ATCC和韓國細胞株銀行之已知為CA125陽性癌細胞株的A549癌細胞株以及已知為CA125陰性癌細胞株的A431癌細胞株來偵測。在此情況下，CA125陽性癌細胞株和CA125陰性癌細胞株係基於由CCLE (癌細胞株百科全書)提供的各個癌細胞株的CA125的mRNA位準來分類。

【0569】 具體而言，將基因組DNA從該CA125陽性癌細胞株和CA125陰性癌細胞株的各者提取出來，接著藉由超音波處理，以產生fDNA。將50 ng/μL fDNA加至PBS，然後加入奈米線並反應20分鐘，以單離彼等。之後，在95 °C的溫度下經歷溫度變性過程1分鐘，然後加入生物素化CA125探針，再反應20分鐘。在此情況下，所使用的探針顯示於下表15。

【表15】

	序列(5'->3')	序列ID號.
生物素化CA125(MUC16基因)探針1	CTGGAACTGATTCTATCAACC	33
生物素化CA125(MUC16基因)探針2	TGTGGCAGAAACCAGCTATCC	34
生物素化CA125(MUC16基因)探針3	GAGGTCCTGAGGATGTGTCAT	35

【0570】 為了比色偵測，以TMB (3,3',5,5'-四甲基聯苯胺)和H_2O_2加至乙酸鈉緩衝液的溶液處理，以確認偵測結果。分析各個癌細胞株的基於DNA的CA125表現(ΔOD)的結果是，在兩個重複實驗中，僅在A549 癌細胞株的fDNA中觀察到清楚的CA125 DNA表現(ΔOD；截止OD > 0.010)。另一方面，在兩個重複實驗中，A431癌細胞株中未觀察到CA125 DNA表現(圖23和圖24)。

範例2.5.AFP的偵測

【0571】 AFP是使用取自ATCC和韓國細胞株銀行之已知為AFP陽性癌細胞株的Huh7、HepG2, Hep3B與PLC癌細胞株以及已知為AFP陰性癌細胞株的SNU475、SNU387、SNU423、SNU449、SK Hep1與HeLa癌細胞株來偵測。在此情況下，AFP陽性癌細胞株和AFP陰性癌細胞株係基於由CCLE (癌細胞株百科全

書)提供的各個癌細胞株的AFP的mRNA位準來分類。

【0572】 具體而言，將基因組DNA從該AFP陽性癌細胞株和AFP陰性癌細胞株的各者提取出來，接著藉由超音波處理，以產生fDNA。將50 ng/μL fDNA加至PBS，然後加入奈米線並反應20分鐘，以單離彼等。之後，在95 °C的溫度下經歷溫度變性過程1分鐘，然後加入生物素化AFP探針，再反應20分鐘。在此情況下，所使用的探針顯示於下表16。

【表16】

	序列(5'->3')	序列ID號.
生物素化AFP探針1	TGAGTCAGAAGTTTACCAAAG	36
生物素化AFP探針2	TGCAAACTGACCACGCTGGAA	37
生物素化AFP探針3	CTTGAATGCCAAGATAAAGGA	38

【0573】 為了比色偵測，以TMB (3,3',5,5'-四甲基聯苯胺)和H_2O_2加至乙酸鈉緩衝液的溶液處理，以確認偵測結果。分析各個癌細胞株的基於DNA的AFP表現(ΔOD)的結果是，在兩個重複實驗中，僅在Huh7、HepG2、Hep3B與PLC癌細胞株的fDNA中觀察到清楚的AFP DNA表現(ΔOD；截止OD > 0.010)。另一方面，在兩個重複實驗中，在SNU475、SNU387、SNU423、SNU449、SK Hep1與HeLa癌細胞株中未觀察到AFP DNA表現(圖25和圖26)。

III. 使用癌症患者的血漿或尿液偵測生物標記的確認

範例3.衍生自癌症患者之生物標記的偵測

範例3.1.使用前列腺癌患者的血漿偵測腫瘤標記的確認

【0574】 從取自正常人或前列腺癌患者的血漿偵測PSA、PSMA、PAP與PCA3前列腺癌腫瘤標記。作為前列腺癌標記，PSA、PSMA、PAP與PCA3在前列腺癌患者中係高度表現，目前用於經由癌症組織和血液測試確認前列腺癌抗原(PSA、PSMA、PAP與PCA3)的位準來判定前列腺癌。

【0575】 具體而言，從正常人或前列腺癌患者獲取血漿，然後加入奈米線並反應20分鐘，以單離ctDNA (循環腫瘤DNA)。在此情況下，使ctDNA附接至奈米線以形成複合物。實驗是在i)當ctDNA與奈米線的複合物是在27 °C的溫度下使用而無溫度變性時，以及ii)當ctDNA與奈米線的複合物是在歷經95 °C的溫度下持續1分鐘的溫度變性過程之後使用時分別進行。之後，加入各個生物化探針和HRP及鏈黴抗生物素蛋白標示之聚(吡咯)奈米顆粒(HRP/st-帶標NPs)，再反應20分鐘。在此情況下，所使用的探針顯示於下表17。

【表17】

	序列(5'->3')	序列ID號.
生物素化PSA(KLK3)探針1	CAGTCTGCGGCGGTGTTCTGG	26
生物素化PSA(KLK3)探針2	GCAAGTTCACCCTCAGAAGGT	27
生物素化PSA(KLK3)探針3	GAGGTCCAGGGTTGCTAGGAA	28
生物素化PSMA(FOLH1)探針1	CATAGTGCTCCCTTTTGATTG	39
生物素化PSMA(FOLH1)探針2	AGTGGAAAGAATTTGGCCTGG	40
生物素化PSMA(FOLH1)探針3	ACCTAGAAGAACAATTTTGTT	41
生物素化PAP(前列腺酸性磷酸酶；ACPP基因)探針1	GCAGCATTATGAACTTGGAGA	42
生物素化PAP(前列腺酸性磷酸酶；ACPP基因)探針2	TCGGAATGAGACGCAGCACGA	43
生物素化PCA3(前列腺癌抗原3；PCA3基因)探針1	CTTAGTGTTTCAATGAACACC	44
生物素化PCA3(前列腺癌抗原3；PCA3基因)探針2	GCTTAGCCTTGTACTGAGGCT	45

【0576】 為了比色偵測，以TMB和H_2O_2加至乙酸鈉緩衝液的溶液處理，以確認PSA、PSMA、PAP與PAC3的表現。分析PSA、PSMA、PAP與PAC3 ctDNA表現(ΔOD)的結果是，當未經歷溫度變性或當經歷溫度變性過程時，在前列腺癌患者中觀察到清楚的PSA、PSMA、PAP與PAC3 ctDNA表現(ΔOD；截止OD >

0.015)。另一方面，當未經歷溫度變性或當經歷溫度變性過程時，皆未在正常人中觀察到PSA、PSMA、PAP與PAC3 ctDNA表現(ΔOD；截止OD > 0.015) (圖27至32)。

範例3.2.使用肺癌患者的血漿偵測腫瘤標記的確認

【0577】 從取自正常人或肺癌患者的血漿偵測NSE、SCC、CEA、Cyfra21-1、TPA肺癌腫瘤標記。作為肺癌標記，NSE、SCC、CEA、Cyfra21-1、TPA在肺癌患者中係高度表現，目前用於經由癌症組織和血液測試確認肺癌抗原(NSE、SCC、CEA、Cyfra21-1、TPA)的位準來判定肺癌。

【0578】 具體而言，從正常人或肺癌患者獲取血漿，然後加入奈米線並反應20分鐘，以單離ctDNA (循環腫瘤DNA)。在此情況下，使ctDNA附接至奈米線以形成複合物。實驗是在i)當ctDNA與奈米線的複合物是在27 °C的溫度下使用而無溫度變性時，以及ii)當ctDNA與奈米線的複合物是在歷經95 °C的溫度下持續1分鐘的溫度變性過程之後使用時分別進行。之後，加入各個生物化探針和HRP及鏈黴抗生物素蛋白標示之聚(吡咯)奈米顆粒(HRP/st-帶標NPs)，再反應20分鐘。在此情況下，所使用的探針顯示於下表18。

【表18】

	序列(5'->3')	序列ID號.
生物素化NSE(神經元特異性烯醇酶；ENO2基因)探針1	CCATAGAGAAGATCTGGGCCC	46
生物素化NSE(神經元特異性烯醇酶；ENO2基因)探針2	GATCCTCCCAGTGGGAGCTGA	47
生物素化NSE(神經元特異性烯醇酶；ENO2基因)探針3	GGTCATGGTGAGTCATCGCTC	48
生物素化SCC(鱗狀細胞癌抗原；SART3基因)探針1	GCTGGAGTGGCTGCATGACGA	49
生物素化SCC(鱗狀細胞癌抗原；SART3基因)探針2	GCGCCCTGGTCGAGAACTGCC	50
生物素化SCC(鱗狀細胞癌抗原；SART3基因)探針3	GTGGCTAGAGTATTACAACCT	51

生物素化SCC(鱗狀細胞癌抗原；SART3基因)探針4	TCGAGAACAGCATCCCTGCAG	52
生物素化CEA(前列腺酸性磷酸酶；ACPP基因)探針1	AATCTGAACCTCTCCTGCCAC	23
生物素化CEA(前列腺酸性磷酸酶；ACPP基因)探針2	ACCCTTCATCACCAGCAACAA	24
生物素化CEA(前列腺酸性磷酸酶；ACPP基因)探針3	TATTCTTGGCTGATTGATGGG	25
生物素化CEA(前列腺酸性磷酸酶；ACPP基因)探針4	CAGCAACAACTCCAAACCCGT	26
生物素化Cyfra21-1(細胞角質蛋白19-片段；KRT19基因)探針1	CTGGCCTCCTACCTGGACAA	53
生物素化Cyfra21-1(細胞角質蛋白19-片段；KRT19基因)探針2	GACCTGGAGATGCAGATCGAA	54
生物素化Cyfra21-1(細胞角質蛋白19-片段；KRT19基因)探針3	GTCGCTGGCCACACGGAGCAG	55
生物素化TPA(組織型血纖維蛋白溶酶原活化因子；PLAT基因)探針1	GCTGTGAAGCAATCATGGATG	56
生物素化TPA(組織型血纖維蛋白溶酶原活化因子；PLAT基因)探針2	GCACCTGCCAGCAGGCCCTGT	57
生物素化TPA(組織型血纖維蛋白溶酶原活化因子；PLAT基因)探針3	ACTGGACGGAGTGTGAGCTCT	58

【0579】 為了比色偵測，以TMB和H_2O_2加至乙酸鈉緩衝液的溶液處理，以確認NSE、SCC、CEA、Cyfra21-1、TPA的表現。分析基於ctDNA的NSE、SCC、CEA、Cyfra21-1、TPA ctDNA表現(ΔOD)的結果是，當未經歷溫度變性或當經歷溫度變性過程時，在兩位肺癌患者中觀察到清楚的NSE、SCC、CEA、Cyfra21-1、TPA ctDNA表現(ΔOD；截止OD > 0.010)。另一方面，當未經歷溫度變性或當經歷溫度變性過程時，皆未在正常人中觀察到NSE、SCC、CEA、Cyfra21-1、TPA ctDNA表現(ΔOD；截止OD > 0.010) (圖33至35)。

範例3.3.使用甲狀腺癌患者的血漿偵測腫瘤標記的確認

【0580】 從取自正常人或甲狀腺癌患者的血漿偵測CEA、NSE、TG、CALCA甲狀腺癌腫瘤標記。作為甲狀腺癌標記，CEA、NSE、TG、CALCA在甲狀腺癌

患者中係高度表現，目前用於經由癌症組織和血液測試確認甲狀腺癌抗原(CEA、NSE、TG、CALCA)的位準來判定甲狀腺癌。

【0581】具體而言，從正常人或甲狀腺癌患者獲取血漿，然後加入奈米線並反應20分鐘，以單離ctDNA (循環腫瘤DNA)。在此情況下，使ctDNA附接至奈米線以形成複合物。實驗是在i)當ctDNA與奈米線的複合物是在27 °C的溫度下使用而無溫度變性時，以及ii)當ctDNA與奈米線的複合物是在歷經95 °C的溫度下持續1分鐘的溫度變性過程之後使用時分別進行。之後，加入各個生物化探針和HRP及鏈黴抗生物素蛋白標示之聚(吡咯)奈米顆粒(HRP/st-帶標NPs)，再反應20分鐘。在此情況下，所使用的探針顯示於下表19。

【表19】

	序列(5'->3')	序列ID號.
生物素化CEA(前列腺酸性磷酸酶；ACPP基因)探針1	AATCTGAACCTCTCCTGCCAC	23
生物素化CEA(前列腺酸性磷酸酶；ACPP基因)探針2	ACCCTTCATCACCAGCAACAA	24
生物素化CEA(前列腺酸性磷酸酶；ACPP基因)探針3	TATTCTTGGCTGATTGATGGG	25
生物素化CEA(前列腺酸性磷酸酶；ACPP基因)探針4	CAGCAACAACTCCAAACCCGT	26
生物素化NSE(神經元特異性烯醇酶；ENO2基因)探針1	CCATAGAGAAGATCTGGGCCC	46
生物素化NSE(神經元特異性烯醇酶；ENO2基因)探針2	GATCCTCCCAGTGGGAGCTGA	47
生物素化NSE(神經元特異性烯醇酶；ENO2基因)探針3	GGTCATGGTGAGTCATCGCTC	48
生物素化甲狀腺球蛋白(TG基因)探針1	CAACACCACAGACATGATGAT	59
生物素化甲狀腺球蛋白(TG基因)探針2	TGCGGCCTGGCTCGAGCAGCA	60
生物素化甲狀腺球蛋白(TG基因)探針3	AATCAATCACTATCCAGCCAG	61
生物素化甲狀腺球蛋白(TG基因)探	ACTCTCTGGAGCACTCCACGG	62

針4		
生物素化抑鈣素(抑鈣素基因相關肽；CALCA基因)探針1	GAGGTGTCATGGGCTTCCAAA	63
生物素化抑鈣素(抑鈣素基因相關肽；CALCA基因)探針2	GTAATCTGAGTACTTGCATGC	64

【0582】 為了比色偵測，以TMB和H_2O_2加至乙酸鈉緩衝液的溶液處理，以確認CEA、NSE、TG、CALCA的表現。分析基於ctDNA的CEA、NSE、TG、CALCA ctDNA表現(ΔOD)的結果是，當未經歷溫度變性或當經歷溫度變性過程時，在甲狀腺癌患者中觀察到清楚的CEA、NSE、TG、CALCA ctDNA表現(ΔOD；截止OD > 0.010)。另一方面，當未經歷溫度變性或當經歷溫度變性過程時，皆未在正常人中觀察到CEA、NSE、TG、CALCA ctDNA表現(ΔOD；截止OD > 0.010) (圖36至40)。

範例3.4.使用膀胱癌患者的血漿偵測腫瘤標記的確認

【0583】 從取自正常人或膀胱癌患者的血漿偵測OGT、FGFR3、TP53、NMP22、Cyfra21-1膀胱癌腫瘤標記。作為膀胱癌標記，OGT、FGFR3、TP53、NMP22、Cyfra21-1在膀胱癌患者的尿液中係高度表現，可用於判定膀胱癌。

【0584】 具體而言，從正常人或膀胱癌患者獲取尿液，然後加入奈米線並反應20分鐘，以單離ctDNA (循環腫瘤DNA)。在此情況下，使ctDNA附接至奈米線以形成複合物。實驗是在i)當ctDNA與奈米線的複合物是在27 °C的溫度下使用而無溫度變性時，以及ii)當ctDNA與奈米線的複合物是在歷經95 °C的溫度下持續1分鐘的溫度變性過程之後使用時分別進行。之後，加入各個生物化探針和HRP及鏈黴抗生物素蛋白標示之聚(吡咯)奈米顆粒(HRP/st-帶標NPs)，再反應20分鐘。在此情況下，所使用的探針顯示於下表20。

【表20】

	序列(5'->3')	序列ID號.
生物素化OGT(O-GlcNAc轉移酶)探針1	ATGGCGTCTTCCGTGGGC	21

生物素化OGT(O-GlcNAc轉移酶)探針2	TGCCCTGTGGCCATGGAC	22
生物素化FGFR3探針1	AGTGGCGGTGGTGGTGAGGGAG	65
生物素化FGFR3探針2	CCCACAGCTTCTGCCCCCGA	66
生物素化FGFR3探針3	GGGCATCCATGGGAGCC	67
生物素化FGFR3探針4	CAGCGTGGGCCGAGGT	68
生物素化FGFR3探針5	CCCTGAGATGCTGGGAGCAG	69
生物素化FGFR3探針6	GTGTGGGAAGGCGGTGTTG	70
生物素化TP53探針1	GCCCTGACTTTCAACTCTG	71
生物素化TP53探針2	ACGACAGGGCTGGTTGCC	72
生物素化TP53探針3	TCCCCAGGCCTCTGATTCC	73
生物素化TP53探針4	CCTCCAGGTGAGCAGTAG	74
生物素化TP53探針5	CTTGGGCCTGTGTTATCTC	75
生物素化TP53探針6	CCCACCTCTTACCGATTT	76
生物素化TP53探針7	ACAAGGGTGGTTGGGAGTAG	77
生物素化TP53探針8	GGACAAGAAGCGGTGGAGG	78
生物素化Cyfra21-1(細胞角質蛋白19-片段；KRT19基因)探針1	CTGGCCTCCTACCTGGACAA	53
生物素化Cyfra21-1(細胞角質蛋白19-片段；KRT19基因)探針2	GACCTGGAGATGCAGATCGAA	54
生物素化Cyfra21-1(細胞角質蛋白19-片段；KRT19基因)探針3	GTCGCTGGCCACACGGAGCAG	55
生物素化NMP22(核基質蛋白-22；NUMA1基因)探針1	ATGGCACTGAAGAGGGACAGC	79
生物素化NMP22(核基質蛋白-22；NUMA1基因)探針2	GCCAAGGAAGAGCTGGAGCAG	80
生物素化NMP22(核基質蛋白-22；NUMA1基因)探針3	GAGCAGCTAGAGGTATTTCAG	81

生物素化NMP22(核基質蛋白-22；NUMA1基因)探針4	AGGTAGAATCCCTGGAGAGTC	82

【0585】 為了比色偵測，以TMB和H_2O_2加至乙酸鈉緩衝液的溶液處理，以確認OGT、FGFR3、TP53、NMP22、Cyfra21-1的表現。分析基於ctDNA的OGT、FGFR3、TP53、NMP22、Cyfra21-1 ctDNA表現(ΔOD)的結果是，當未經歷溫度變性或當經歷溫度變性過程時，在膀胱癌患者中觀察到清楚的OGT、FGFR3、TP53、NMP22、Cyfra21-1 ctDNA表現(ΔOD；截止OD > 0.010)。另一方面，當未經歷溫度變性或當經歷溫度變性過程時，皆未在正常人中觀察到OGT、FGFR3、TP53、NMP22、Cyfra21-1 ctDNA表現(ΔOD；截止OD > 0.010) (圖41至46)。

範例3.5.使用乳癌患者的血漿偵測腫瘤標記的確認

【0586】 從取自正常人或乳癌患者的血漿偵測CA27-29、CA15-3、CEA乳癌腫瘤標記。作為乳癌標記，CA27-29、CA15-3、CEA在乳癌患者中係高度表現，目前用於經由癌症組織和血液測試確認乳癌抗原(CA27-29、CA15-3、CEA)的位準來判定乳癌。

【0587】 具體而言，從正常人或乳癌患者獲取血漿，然後加入奈米線並反應20分鐘，以單離ctDNA (循環腫瘤DNA)。在此情況下，使ctDNA附接至奈米線以形成複合物。實驗是在i)當ctDNA與奈米線的複合物是在27 °C的溫度下使用而無溫度變性時，以及ii)當ctDNA與奈米線的複合物是在歷經95 °C的溫度下持續1分鐘的溫度變性過程之後使用時分別進行。之後，加入各個生物化探針和HRP及鏈黴抗生物素蛋白標示之聚(吡咯)奈米顆粒(HRP/st-帶標NPs)，再反應20分鐘。在此情況下，所使用的探針顯示於下表21。

【表21】

	序列(5'->3')	序列ID號.
生物素化CA27.29/CA15-3(癌抗原15-3；MUC1基因)探針1	GCGCCTGCCTGAATCTGTTCT	83
生物素化CA27.29/CA15-3(癌抗原	TTCTGGGCCTCTCCAAT	84

15-3；MUC1基因)探針2	ATTA	
生物素化CA27.29/CA15-3(癌抗原15-3；MUC1基因)探針3	GGATACCTACCATCCTATGAG	85
生物素化CEA(前列腺酸性磷酸酶；ACPP基因)探針1	AATCTGAACCTCTCCTGCCAC	23
生物素化CEA(前列腺酸性磷酸酶；ACPP基因)探針2	ACCCTTCATCACCAGCAACAA	24
生物素化CEA(前列腺酸性磷酸酶；ACPP基因)探針3	TATTCTTGGCTGATTGATGGG	25
生物素化CEA(前列腺酸性磷酸酶；ACPP基因)探針4	CAGCAACAACTCCAAACCCGT	26

【0588】 為了比色偵測，以TMB和H_2O_2加至乙酸鈉緩衝液的溶液處理，以確認CA27-29、CA15-3、CEA的表現。分析基於ctDNA的CA27-29、CA15-3、CEA ctDNA表現(ΔOD)的結果是，當未經歷溫度變性或當經歷溫度變性過程時，在乳癌患者中觀察到清楚的CA27-29、CA15-3、CEA ctDNA表現(ΔOD；截止OD > 0.010)。另一方面，當未經歷溫度變性或當經歷溫度變性過程時，皆未在正常人中觀察到CA27-29、CA15-3、CEA ctDNA表現(ΔOD；截止OD > 0.010) (圖47至50)。

範例3.6.使用大腸直腸癌患者的血漿偵測腫瘤標記的確認

【0589】 從取自正常人或大腸直腸癌患者的血漿偵測CEA、CA19-9大腸直腸癌腫瘤標記。作為大腸直腸癌標記，CEA、CA19-9在大腸直腸癌患者中係高度表現，目前用於經由癌症組織和血液測試確認大腸直腸癌抗原(CEA、CA19-9)的位準來判定大腸直腸癌。

【0590】 具體而言，從正常人或大腸直腸癌患者獲取血漿，然後加入奈米線並反應20分鐘，以單離ctDNA (循環腫瘤DNA)。在此情況下，使ctDNA附接至奈米線以形成複合物。實驗是在i)當ctDNA與奈米線的複合物是在27 °C的溫度下使用而無溫度變性時，以及ii)當ctDNA與奈米線的複合物是在歷經95 °C的溫度下持續1分鐘的溫度變性過程之後使用時分別進行。之後，加入各個生物化探針

和HRP及鏈黴抗生物素蛋白標示之聚(吡咯)奈米顆粒(HRP/st-帶標NPs)，再反應20分鐘。在此情況下，所使用的探針顯示於下表22。

【表22】

	序列(5'->3')	序列ID號.
生物素化CEA(前列腺酸性磷酸酶；ACPP基因)探針1	AATCTGAACCTCTCCTGCCAC	23
生物素化CEA(前列腺酸性磷酸酶；ACPP基因)探針2	ACCCTTCATCACCAGCAACAA	24
生物素化CEA(前列腺酸性磷酸酶；ACPP基因)探針3	TATTCTTGGCTGATTGATGGG	25
生物素化CEA(前列腺酸性磷酸酶；ACPP基因)探針4	CAGCAACAACTCCAAACCCGT	26
生物素化CA19-9(FLU3基因)探針1	GATCATCACGGCACGGTC	30
生物素化CA19-9(FLU3基因)探針2	GTGCAGAGAGATCATCACGGC	31
生物素化CA19-9(FLU3基因)探針3	TCTCTCTTACCTGGGACCTCA	32

【0591】 為了比色偵測，以TMB和H_2O_2加至乙酸鈉緩衝液的溶液處理，以確認CEA、CA19-9的表現。分析基於ctDNA的CEA、CA19-9 ctDNA表現(ΔOD)的結果是，當未經歷溫度變性或當經歷溫度變性過程時，在大腸直腸癌患者中觀察到清楚的CEA、CA19-9 ctDNA表現(ΔOD；截止OD > 0.010)。另一方面，當未經歷溫度變性或當經歷溫度變性過程時，皆未在正常人中觀察到CEA、CA19-9 ctDNA表現(ΔOD；截止OD > 0.010) (圖51至55)。

範例3.7.使用膽管癌患者的血漿偵測腫瘤標記的確認

【0592】 從取自正常人或膽管癌患者的血漿偵測CEA、CA19-9、CA125膽管癌腫瘤標記。作為膽管癌標記，CEA、CA19-9、CA125在膽管癌患者中係高度表現，目前用於經由血液測試確認膽管癌抗原(CEA、CA19-9、CA125)的位準來判定膽管癌。

【0593】 具體而言，從正常人或膽管癌患者獲取血漿，然後加入奈米線並

反應20分鐘，以單離ctDNA (循環腫瘤DNA)。在此情況下，使ctDNA附接至奈米線以形成複合物。實驗是在i)當ctDNA與奈米線的複合物是在27 °C的溫度下使用而無溫度變性時，以及ii)當ctDNA與奈米線的複合物是在歷經95 °C的溫度下持續1分鐘的溫度變性過程之後使用時分別進行。之後，加入各個生物化探針和HRP及鏈黴抗生物素蛋白標示之聚(吡咯)奈米顆粒(HRP/st-帶標NPs)，再反應20分鐘。在此情況下，所使用的探針顯示於下表23。

【表23】

	序列(5'->3')	序列ID號.
生物素化CEA(前列腺酸性磷酸酶；ACPP基因)探針1	AATCTGAACCTCTCCTGCCAC	23
生物素化CEA(前列腺酸性磷酸酶；ACPP基因)探針2	ACCCTTCATCACCAGCAACAA	24
生物素化CEA(前列腺酸性磷酸酶；ACPP基因)探針3	TATTCTTGGCTGATTGATGGG	25
生物素化CEA(前列腺酸性磷酸酶；ACPP基因)探針4	CAGCAACAACTCCAAACCCGT	26
生物素化CA19-9(FLU3基因)探針1	GATCATCACGGCACGGTC	30
生物素化CA19-9(FLU3基因)探針2	GTGCAGAGAGATCATCACGGC	31
生物素化CA19-9(FLU3基因)探針3	TCTCTCTTACCTGGGACCTCA	32
生物素化CA125(MUC16基因)探針1	CTGGAACTGATTCTATCAACC	33
生物素化CA125(MUC16基因)探針2	TGTGGCAGAAACCAGCTATCC	34
生物素化CA125(MUC16基因)探針3	GAGGTCCTGAGGATGTGTCAT	35

【0594】 為了比色偵測，以TMB和H_2O_2加至乙酸鈉緩衝液的溶液處理，以確認CEA、CA19-9、CA125的表現。分析基於ctDNA的CEA、CA19-9、CA125 ctDNA表現(ΔOD)的結果是，當未經歷溫度變性或當經歷溫度變性過程時，在膽管癌患者中觀察到清楚的CEA、CA19-9、CA125 ctDNA表現(ΔOD；截止OD >

0.010)。另一方面，當未經歷溫度變性或當經歷溫度變性過程時，皆未在正常人中觀察到CEA、CA19-9、CA125 ctDNA表現(ΔOD；截止OD > 0.010) (圖56至58)。

範例3.8.使用胃癌患者的血漿偵測腫瘤標記的確認

【0595】從取自正常人或胃癌患者的血漿偵測CEA、CA19-9、CGB、Cyfra21-1胃癌腫瘤標記。作為胃癌標記，CEA、CA19-9、CGB、Cyfra21-1在胃癌患者中係高度表現，目前用於經由血液測試確認胃癌抗原(CEA、CA19-9、CGB、Cyfra21-1)的位準來判定胃癌。

【0596】具體而言，從正常人或胃癌患者獲取血漿，然後加入奈米線並反應20分鐘，以單離ctDNA (循環腫瘤DNA)。在此情況下，使ctDNA附接至奈米線以形成複合物。實驗是在i)當ctDNA與奈米線的複合物是在27 °C的溫度下使用而無溫度變性時，以及ii)當ctDNA與奈米線的複合物是在歷經95 °C的溫度下持續1分鐘的溫度變性過程之後使用時分別進行。之後，加入各個生物化探針和HRP及鏈黴抗生物素蛋白標示之聚(吡咯)奈米顆粒(HRP/st-帶標NPs)，再反應20分鐘。在此情況下，所使用的探針顯示於下表24。

【表24】

	序列(5'->3')	序列ID號.
生物素化CEA(前列腺酸性磷酸酶；ACPP基因)探針1	AATCTGAACCTCTCCTGCCAC	23
生物素化CEA(前列腺酸性磷酸酶；ACPP基因)探針2	ACCCTTCATCACCAGCAACAA	24
生物素化CEA(前列腺酸性磷酸酶；ACPP基因)探針3	TATTCTTGGCTGATTGATGGG	25
生物素化CEA(前列腺酸性磷酸酶；ACPP基因)探針4	CAGCAACAACTCCAAACCCGT	26
生物素化CA19-9(FLU3基因)探針1	GATCATCACGGCACGGTC	30
生物素化CA19-9(FLU3基因)探針2	GTGCAGAGAGATCATCACGGC	31
生物素化CA19-9(FLU3基因)探針3	TCTCTCTTACCTGGGACCTCA	32

生物素化乙型HCG(人類絨毛膜促性腺激素； CGB基因)探針1	TGCTGAGCATGGGCGGGACAT	86
生物素化乙型HCG(人類絨毛膜促性腺激素； CGB基因)探針2	TGGCTCTCAGCTGTCAATGTG	87
生物素化Cyfra21-1(細胞角質蛋白19-片段；KRT19基因)探針1	CTGGCCTCCTACCTGGACAA	53
生物素化Cyfra21-1(細胞角質蛋白19-片段；KRT19基因)探針2	GACCTGGAGATGCAGATCGAA	54
生物素化Cyfra21-1(細胞角質蛋白19-片段；KRT19基因)探針3	GTCGCTGGCCACACGGAGCAG	55

【0597】 為了比色偵測，以TMB和H_2O_2加至乙酸鈉緩衝液的溶液處理，以確認CEA、CA19-9、CGB、Cyfra21-1的表現。分析基於ctDNA的CEA、CA19-9、CGB、Cyfra21-1 ctDNA表現(ΔOD)的結果是，當未經歷溫度變性或當經歷溫度變性過程時，在胃癌患者中觀察到清楚的CEA、CA19-9、CGB、Cyfra21-1 ctDNA表現(ΔOD；截止OD > 0.010)。另一方面，當未經歷溫度變性或當經歷溫度變性過程時，皆未在正常人中觀察到CEA、CA19-9、CGB、Cyfra21-1 ctDNA表現(ΔOD；截止OD > 0.010) (圖59至61)。

範例3.9.使用胰臟癌患者的血漿偵測腫瘤標記的確認

【0598】 從取自正常人或胰臟癌患者的血漿偵測CA19-9、CA125、CEA胰臟癌腫瘤標記。

【0599】 具體而言，從正常人或胰臟癌患者獲取血漿，然後加入奈米線並反應20分鐘，以單離ctDNA (循環腫瘤DNA)。在此情況下，使ctDNA附接至奈米線以形成複合物。實驗是在i)當ctDNA與奈米線的複合物是在27 °C的溫度下使用而無溫度變性時，以及ii)當ctDNA與奈米線的複合物是在歷經95 °C的溫度下持續1分鐘的溫度變性過程之後使用時分別進行。之後，加入各個生物化探針和HRP及鏈黴抗生物素蛋白標示之聚(吡咯)奈米顆粒(HRP/st-帶標NPs)，再反應20分鐘。在此情況下，所使用的探針顯示於下表25。

【表25】

	序列(5'->3')	序列ID號.
生物素化CEA(前列腺酸性磷酸酶；ACPP基因)探針1	AATCTGAACCTCTCCTGCCAC	23
生物素化CEA(前列腺酸性磷酸酶；ACPP基因)探針2	ACCCTTCATCACCAGCAACAA	24
生物素化CEA(前列腺酸性磷酸酶；ACPP基因)探針3	TATTCTTGGCTGATTGATGGG	25
生物素化CEA(前列腺酸性磷酸酶；ACPP基因)探針4	CAGCAACAACTCCAAACCCGT	26
生物素化CA19-9(FLU3基因)探針1	GATCATCACGGCACGGTC	30
生物素化CA19-9(FLU3基因)探針2	GTGCAGAGAGATCATCACGGC	31
生物素化CA19-9(FLU3基因)探針3	TCTCTCTTACCTGGGACCTCA	32

【0600】 為了比色偵測，以TMB和H_2O_2加至乙酸鈉緩衝液的溶液處理，以確認CA19-9、CA125、CEA的表現。分析基於ctDNA的CA19-9、CA125、CEA ctDNA表現(ΔOD)的結果是，當未經歷溫度變性時，在胰臟癌患者中觀察到清楚的CA19-9、CA125、CEA ctDNA表現(ΔOD；截止OD > 0.010)。另一方面，當未經歷溫度變性時，在正常人中未觀察到CA19-9、CA125、CEA ctDNA表現(ΔOD；截止OD > 0.010) (圖62至69)。

IV. 評估用於癌症的早期診斷和預後預測的腫瘤標記偵測

範例4.衍生自癌症患者之生物標記的偵測

範例4.1.使用癌症病患的血漿或尿液偵測CPT1A

【0601】 從取自正常人或肺癌患者的血漿或尿液偵測CPT1A(肉鹼棕櫚醯基轉移酶1A)。此外，從取自膀胱癌患者的尿液偵測CPT1A。CPT1A可用作癌症的診斷目標，因為已知癌組織中的CPT1A表現比正常組織中顯著增加。

【0602】 具體而言，獲取血漿或尿液，然後加入奈米線並反應20分鐘，以單離ctDNA (循環腫瘤DNA)。在此情況下，使ctDNA附接至奈米線以形成複合物。實驗是在i)當ctDNA與奈米線的複合物是在27 °C的溫度下使用而無溫度變性時，

以及ii)當ctDNA與奈米線的複合物是在歷經95 °C的溫度下持續1分鐘的溫度變性過程之後使用時分別進行。之後，加入各個生物化探針和HRP及鏈黴抗生物素蛋白標示之聚(吡咯)奈米顆粒(HRP/st-帶標NPs)，再反應20分鐘。在此情況下，所使用的探針顯示於下表26。

【表26】

	序列(5'->3')	序列ID號.
生物素化CPT1A探針1	GAGCCATGAAGCTCTTAGACA	88
生物素化CPT1A探針2	CTTCCAGACATCGCTGCCTCG	89
生物素化CPT1A探針3	TGGACAATACCTCGGAGCCTC	90
生物素化CPT1A探針4	CATGACCCGGCTCTTCCGAGA	91

【0603】 為了比色偵測，以TMB和H_2O_2加至乙酸鈉緩衝液的溶液處理，以確認CPT1A的表現。分析基於ctDNA的CPT1A ctDNA表現(ΔOD)的結果是，當未經歷溫度變性或當經歷溫度變性過程時，在肺癌患者或膀胱癌患者中觀察到清楚的CPT1A ctDNA表現(ΔOD；截止OD > 0.010)。另一方面，當未經歷溫度變性或當經歷溫度變性過程時，皆未在正常人中觀察到CPT1A ctDNA表現(ΔOD；截止OD > 0.010) (圖70至73)。

範例4.2.使用癌細胞株確認IFN-γ、IFN-γ受體和PD-L1表現

【0604】 IFN-γ、IFN-γ受體和PD-L1偵測的準確性是使用取自ATCC和韓國細胞株銀行之已知為PD-L1陽性癌細胞株的MDA-MB-231、HCC827、H1975、PC9與H460癌細胞株以及已知為PD-L1陰性癌細胞株的A549、MDA-MB-461、HeLa與MCF7癌細胞株來評估。在此情況下，PD-L1陽性癌細胞株和PD-L1陰性癌細胞株係基於由CCLE (癌細胞株百科全書)提供的各個癌細胞株的PD-L1的mRNA位準來分類。將相同細胞的$1x10^6$個細胞培養在100 mm的培養皿中，然後在一個培養皿中加入10 nmol INF-γ，其餘培養皿則不經INF-γ處理，將彼等培養持續一天，

然後從PD-L1陽性癌症細胞株和PD-L1陰性癌細胞株提取基因組DNA。

【0605】之後，經超音波處理，以產生200 bp或更少的fDNA。將50 ng/μL fDNA加至PBS，然後加入奈米線並反應20分鐘，以單離彼等。之後，在95 °C的溫度下經歷溫度變性過程1分鐘，然後加入生物素化探針及鏈黴抗生物素蛋白標示之聚(吡咯)奈米顆粒(HRP/st-帶標NPs)，再反應20分鐘。在此情況下，所使用的探針顯示於下表27。

【表27】

	序列(5'->3')	序列ID號.
生物素化PD-L1探針1	TGGGAGCCATCTTATTATGCC	1
生物素化PD-L1探針2	CGGAAGATGAATGTCAGTGC	2
生物素化PD-L1探針3	CCTACTGGCATTTGCTGAACG	3
生物素化PD-L1探針4	ACCATAGCTGATCATGCAGCG	4
生物素化IFN-γ探針1	ATCGTATATTGGGAGTACCAG	92
生物素化IFN-γ探針2	TAAATGGAGACGAGCAGGAAG	93
生物素化IFN-γ探針3	TAGTGCTTAGCCTGGTATTCA	94
生物素化PD1探針1	GTACCGCATGAGCCCCAGCAA	95
生物素化PD1探針2	GTTCCAAACCCTGGTGGTTGG	96
生物素化PD1探針3	GAGCAGACGGAGTATGCCAC	97
生物素化IFN-γ受體探針1	ATCGTATATTGGGAGTACCAG	98
生物素化IFN-γ受體探針2	TAAATGGAGACGAGCAGGAAG	99
生物素化IFN-γ受體探針3	TAGTGCTTAGCCTGGTATTCA	100

【0606】為了比色偵測，以TMB和H_2O_2加至乙酸鈉緩衝液的溶液處理，以確認IFN-γ、IFN-γ受體與PD-L1偵測的結果。首先，當無添加IFN-γ時，分析癌細

胞株的基於DNA的PD-L1表現(ΔOD)的結果是，在全部三個實驗中，僅在MDA-MB-231、HCC827、H1975、PC9與H460癌細胞株的fDNA中觀察到清楚的PD-L1 DNA表現(截止：OD > 0.6)。另一方面，在全部三個實驗中，在A549、MDA-MB-461、HeLa與MCF7癌細胞株中未觀察到PD_L1 DNA表現(圖74至圖76)。然而，當添加IFN-γ時，分析癌細胞株的基於DNA的PD-L1表現(ΔOD)的結果是，在全部三個實驗中，在PD-L1陽性癌細胞株MDA-MB-231、HCC827、H1975、PC9與H460以及PD-L1陰性癌細胞株，即A549、MDA-MB-461、HeLa與MCF7觀察到清楚的基於fDNA的PD-L1 DNA表現(截止：OD > 0.6) (圖77)。此外，經由PD-L1陽性癌細胞株MDA-MB-231、HCC827、H1975、PC9與H460以及PD-L1陰性癌細胞株，即A549、MDA-MB-461、HeLa與MCF7的fDNA確認IFN-γ與IFN-γ受體的結果是，在全部三個實驗中，無論是否添加IFN-γ，皆未確認到IFN-γ，而在所有細胞株中皆有確認到IFN-γ受體(圖78和圖79)。

再者，當無添加IFN-γ時及當添加IFN-γ時，在三個重複實驗中經由PD-L1陽性癌細胞株MDA-MB-231、HCC827、H1975、PC9與H460以及PD-L1陰性癌細胞株A549、MDA-MB-461、HeLa與MCF7的fDNA分析PD-L1、IFN-γ與IFN-γ受體的圖表中，在添加IFN-γ時在PD-L1陰性癌細胞株中確認到高度PD-L1 表現，而無論是否添加IFN-γ，皆未確認到IFN-γ，而在所有細胞株中皆有確認到IFN-γ受體(圖80至83)。

【0607】 圖80至83顯示用於在將IFN-γ添加至PD-L1陽性癌細胞株之前與之後分析癌細胞株的基於DNA的PD-L1表現(ΔOD)的圖表(圖80至83)。

V.根據獲取方法偵測癌症相關cfDNA之可能性的確認

範例5.根據收集樣本的方法之生物標記偵測的確認

【0608】 以上述相同方式在肺癌患者與正常人中偵測cfDNA。然而，在收集方法中，是使用注射針從靜脈血液收集及使用採血針從微血管血液收集。所使

用的奈米線和探針是該等根據製備例1和製備例3製備者。顯示了使用注射針取自肺癌患者的血液的癌症相關生物標記，例如AKL融合和PIK3CA的DNA表現位準(圖86)。此外，顯示了使用採血針取自肺癌患者的血液之癌症相關生物標記，例如AKL融合與PIK3CA的DNA表現位準(圖87)。顯示了使用注射針取自正常人的血液之癌症相關生物標記，例如AKL融合與PIK3CA的DNA表現位準(圖88)。此外，測量了使用採血針取自正常人的血液之癌症相關生物標記，例如AKL融合與PIK3CA的DNA表現位準(圖89)。結果是，確認了癌症衍生之生物標記可在靜脈血液和微血管血液以相同方式偵測。

VI. 確認肺癌相關cfDNA之偵測可能性

範例6.肺癌細胞株中之突變生物標記偵測的確認

【0609】 在癌症特異性基因中發生的突變(snp)的存在或不存在係提供用以確認對特定治療方法是否有抗性或對特定治療方法是否具有抗性的有用資訊，於是找出適當的治療方法。

【0610】 為了確認肺癌細胞株的突變也是可偵測的，EML4-ALK基因係經分析。首先，為了確認表現位準，EML4-ALK基因的表現位準係藉由RT-PCR確認。來自EML4-ALK變體3a/b陽性細胞(H2228)與EML4-ALK陰性細胞(A549、H1993、PC9、RT4)癌細胞株的cfDNA之EML4-ALK表現位準是經由RT-PCR確認(圖90)。此外，來自EML4-ALK變體3a/b陽性細胞(H2228)與EML4-ALK陰性細胞(A549、H1993、PC9、RT4)癌細胞株的cfDNA之EML4-ALK表現位準是經由西方墨點法確認(圖91)。此外，顯示經由RT-PCR與西方墨點法確認來自EML4-ALK變體3a/b陽性細胞(H2228)與EML4-ALK陰性細胞(A549、H1993、PC9、RT4)癌細胞株的cfDNA之EML4-ALK表現位準的結果(圖92)。

【0611】 下文，EML4-ALK係藉由本案所述之使用fDNA的方法來偵測。偵測方法係以上述的相同方式進行。結果是，確認了EML4-ALK也可使用fDNA偵

測方法來偵測。顯示了來自EML4-ALK變體3a/b陽性細胞(H2228)與EML4-ALK陰性細胞(A549、H1993、PC9、RT4)癌細胞株的cfDNA之EML4-ALK融合var.1或EML4-ALK融合var.3的DNA表現測量位準(圖93)。此外，顯示了來自EML4-ALK變體3a/b陽性細胞(H2228)與EML4-ALK陰性細胞(A549、H1993、PC9、RT4)癌細胞株的cfDNA之EML4-ALK融合var.1或EML4-ALK融合var.3的DNA表現測量位準(圖94)。

【表28】

EGFR	探針序列
KRAS外顯子2-探針	CP1: AAATGACTGAATATAAACTTG (序列ID號. 127) DP: GAGTGCCTTGACGATACAGCT (序列ID號. 128)
ALK-EML4 變體 1- 探針	CP2: TAGAGCCCACACCTGGGAAA (序列ID號. 129) DP: CGGAGCTTGCTCAGCTTGTA (序列ID號. 130)
ALK-EML4 變體 3- 探針	CP3: GCATAAAGATGTCATCATCAACCAAG (序列ID號. 131) DP: CGGAGCTTGCTCAGCTTGTA (序列ID號. 132)

範例7.肺癌患者中之突變生物標記偵測的確認：抗藥性

【0612】以上述相同方式在肺癌患者中偵測各種突變。在此情況下，作為用於偵測肺癌患者的cfDNA的探針，使用上述互補地結合至肺癌生物標記基因的核酸序列。患者資訊和分析基因係如圖所示。

【0613】具體而言，測量了取自小細胞肺癌患者的血液之癌症相關生物標記，例如EML4-ALK融合var.3、KRAS、SYP、NCAM1與NKX2-1的DNA表現位準(圖95)。結果是，發現EML4-ALK融合在癌症組織和血液中的ctDNA中是相同的，ctDNA的結果是，發現EML4-ALK融合是var.3而非var.1，指出作為ALK TKI的截剋瘤(Crizotinib)回應不佳。

【0614】此外，測量了取自癌症患者的血液之癌症相關生物標記，例如EML4-ALK融合var.1的DNA表現位準(圖96)。結果是，發現EML4-ALK融合在癌症組織和血液中的ctDNA中是相同的，ctDNA的結果是，發現EML4-ALK融合是var.1而非var.3，指出作為ALK TKI的截剋瘤反應良好且獲得部分回應(PR)之患者回應。

【0615】此外，測量了取自癌症患者的血液之癌症相關生物標記，例如EML4-ALK融合var.3的DNA表現位準(圖97)。結果是，發現EML4-ALK融合與癌症組織和血液中的ctDNA是相同的，ctDNA的結果是，發現EML4-ALK融合是var.3而非var.1，指出作為ALK TKI的截剋瘤將回應不佳，於是從一開始就開立安立適以等待患者回應。

【0616】此外，測量了取自癌症患者的血液之癌症相關生物標記，例如EML4-ALK融合var.3、BRAFV800E與TP53的DNA表現位準(圖98)。結果是，發現EML4-ALK融合在癌症組織和血液中的ctDNA中是相同的，ctDNA的結果是，發現EML4-ALK融合是var.3而非var.1，指出作為ALK TKI的截剋瘤回應不佳(PD)。

【0617】此外，測量了取自癌症患者的血液之癌症相關生物標記，例如EML4-ALK融合var.1的DNA表現位準(圖99)。結果是，發現EML4-ALK融合在癌症組織和血液中的ctDNA中是相同的，ctDNA的結果是，發現EML4-ALK融合是var.1而非var.3，指出作為ALK TKI的截剋瘤反應良好且獲得部分回應(PR)之患者回應。

【0618】此外，測量了取自癌症患者的血液之癌症相關生物標記，例如EML4-ALK融合var.1的DNA表現位準(圖100)。結果是，發現EML4-ALK融合在癌症組織和血液中的ctDNA中是相同的，ctDNA的結果是，發現EML4-ALK融合是var.1而非var.3，指出作為ALK TKI的截剋瘤回應良好且獲得部分回應(PR)之患

者回應。

VII. 經由OGT偵測確認診斷膀胱癌的可能性

範例8.確認衍生自癌細胞株的OGT表現位準和fDNA偵測可能性

【0619】 為了確認在癌細胞株中的OGT表現位準和在患者血漿中的偵測可能性，以上述的相同方式使用體外實驗與患者血液樣本執行實驗。圖101顯示經由西方墨點法確認來自各個體外癌細胞株的cfDNA之OGT的蛋白質表現位準的結果。此外，圖102顯示經由RT-PCR確認來自各個體外癌細胞株的cfDNA之OGT的mRNA表現位準的結果。圖103顯示經由RT-PCR確認來自各個體外癌細胞株的cfDNA之OGT的mRNA表現位準的結果。圖104顯示來自各個體外癌細胞株的cfDNA之OGT的DNA表現位準的結果。圖105顯示來自各個體外癌細胞株的cfDNA之OGT的DNA表現位準的結果。圖106顯示經由西方墨點法、RT-PCR與cfDNA偵測確認來自各個體外癌細胞株的OGT表現位準的結果。圖107顯示在不包含磁性奈米顆粒之奈米線所偵測到來自各個體外細胞株之OGT的cfDNA的照片。

範例9.OGT衍生之cfDNA之偵測的確認

【0620】 膀胱癌患者的診斷可能性係使用本發明偵測方法以上述相同方式確認。結果顯示於圖108至113。圖108顯示取自正常人、膀胱炎患者和膀胱癌患者的尿液的 量化cfDNA的圖表。圖109顯示分析取自正常人、膀胱炎患者和膀胱癌患者的尿液的 cfDNA之OGT的DNA表現位準的結果。圖110顯示分析取自正常人、膀胱炎患者和膀胱癌患者的尿液的 cfDNA之OGT的DNA表現位準的結果。圖111至113顯示分析作為盲測而取自幾位癌症患者的尿液的 cfDNA之OGT的DNA表現位準的結果。結果是，確認了膀胱癌可使用上述方法偵測OGT來診斷。

VIII.各種癌症之診斷可能性的確認

範例10.甲狀腺癌之診斷可能性的確認

【0621】使用上述的相同方法，偵測患者的cfDNA以確認是否有可能診斷甲狀腺癌。圖114至116顯示分析取自甲狀腺癌患者組織的cfDNA之BRAF V600E與TERT C250T的DNA表現位準的結果。分析的結果確認，經由本發明的分析方法可準確地診斷甲狀腺癌。

範例11.小細胞肺癌(SCLC)之診斷可能性的確認

【0622】使用上述的相同方法，使用取自小細胞肺癌患者的血液分析癌症相關生物標記，例如SYP、CgA、NCAM1與NKX2-1 (圖117至121)。患者資訊和樣本資訊係如圖所示。分析的結果確認，經由本發明的分析方法可準確地診斷小細胞肺癌。

範例12.非小細胞肺癌(NSCLC)之診斷可能性的確認

【0623】使用上述的相同方法，使用取自非小細胞肺癌患者的血液分析生物標記，例如SYP、CgA、NCAM1與NKX2-1 (圖122)。患者資訊和樣本資訊係如圖所示。分析的結果確認，經由本發明的分析方法可準確地診斷非小細胞肺癌。

範例13.抗癌治療前後之生物標記偵測的比對

【0624】使用上述的相同方法，顯示使用取自抗癌治療之前與之後的肺癌患者的血液之CEA的DNA表現位準以及患者預後的結果(圖123)。分析的結果確認，經由本發明的分析方法可準確地確認癌症治療後的預後。

範例14.肺癌之診斷可能性的確認

【0625】使用上述的相同方法，使用取自肺癌患者的血液分析癌症相關生物標記，例如NSE與CEA (圖124至128)。此外，使用取自正常人的血液分析癌症相關生物標記，例如NSE與CEA (圖129至133)。分析的結果確認，經由本發明的分析方法可準確地診斷肺癌。

範例15.前列腺癌之診斷可能性的確認

【0626】使用上述的相同方法，使用取自前列腺癌患者的血液分析癌症相

關生物標記，例如PSA、PSMA、PAP與PCA3 (圖134)。此外，使用取自正常人的血液分析癌症相關生物標記，例如PSA、PSMA、PAP與PCA3 (圖135)。此外，使用取自前列腺癌患者和正常人的血液分析TMPRSS2-ERG融合的生物標記(圖136)。分析的結果確認，經由本發明的分析方法可準確地診斷前列腺癌。

範例16.甲狀腺癌之診斷可能性的確認

【0627】使用上述的相同方法，使用取自甲狀腺癌患者的血液分析癌症相關生物標記，例如CEA、NSE、TG(甲狀腺球蛋白)與CALCA (圖137)。此外，使用取自正常人的血液分析癌症相關生物標記，例如CEA、NSE、TG(甲狀腺球蛋白)與CALCA (圖138)。此外，使用取自甲狀腺癌患者和正常人的血液分析BRAF突變(V600E)、TERT啟動子突變(C228T, C250T)的DNA表現位準(圖139)。分析的結果確認，經由本發明的分析方法可準確地診斷甲狀腺癌。

範例17.膀胱癌之診斷可能性的確認

【0628】使用上述的相同方法，使用取自膀胱癌患者、血尿患者和正常人的尿液分析OGT、FGFR3、TP53、NMP22和Cyfra21-1的DNA表現位準(圖140)。分析的結果確認，經由本發明的分析方法可準確地診斷膀胱癌。

範例18.乳癌之診斷可能性的確認

【0629】使用上述的相同方法，使用取自乳癌患者和正常人的血液分析CA27-29和CEA的DNA表現位準(圖141)。分析的結果確認，經由本發明的分析方法可準確地診斷乳癌。

範例19.大腸直腸癌之診斷可能性的確認

【0630】使用上述的相同方法，使用取自大腸直腸癌患者和正常人的血液分析CEA和CA19-9的DNA表現位準(圖142)。分析的結果確認，經由本發明的分析方法可準確地診斷大腸直腸癌。

範例20.膽管癌之診斷可能性的確認

【0631】使用上述的相同方法，使用取自膽管癌患者和正常人的血液分析CA19-9、CEA和CA123的DNA表現位準(圖143至144)。分析的結果確認，經由本發明的分析方法可準確地診斷膽管癌。

範例21.胃癌之診斷可能性的確認

【0632】使用上述的相同方法，使用取自胃癌患者和正常人的血液分析CEA、CA19-9、CGB和Cyfra21-1的DNA表現位準(圖145)。分析的結果確認，經由本發明的分析方法可準確地診斷胃癌。

範例22.卵巢癌之診斷可能性的確認

【0633】使用上述的相同方法，使用取自卵巢癌患者和正常人的血液分析CA125和CEA的DNA表現位準(圖146)。分析的結果確認，經由本發明的分析方法可準確地診斷卵巢癌。

範例23.胰臟癌之診斷可能性的確認

【0634】使用上述的相同方法，使用取自胰臟癌患者的血液分析CEA、CA19-9和CA125的DNA表現位準(圖147)。使用取自正常人的血液分析CEA、CA19-9和CA125的DNA表現位準(圖148)。分析的結果確認，經由本發明的分析方法可準確地診斷胰臟癌。

範例24.在正常人樣本中使用cfDNA經由偵測各種癌症生物標記之偵測方法的準確性的確認

【0635】使用上述的相同方法，藉由使用取自正常人的血液測量癌症相關生物標記的DNA表現位準，確認了在正常人中未偵測到癌症相關生物標記(圖149與圖150) (PC：陽性對照組)。

範例25.子宮頸癌之診斷可能性的確認

【0636】使用上述的相同方法，存在於HPV陽性子宮頸癌患者(HPV16 (+)與HPV18 (+))和HPV陰性健康對照組(HPV-)的尿液中的cfDNA與對HPV 18或

HPV 16具有特異性之探針存在或不存在結合係經由吸光度確認(圖153)。此外，使單離自子宮頸癌患者的尿液的cfDNA與對HPV 16、EGFR19缺失、HPV 18及EGFR 21 L858R具有特異性之探針依序地反應之後，確認cfDNA與各探針存在或不存在結合(圖154)。已確認經由本發明的分析方法可準確地診斷子宮頸癌。

範例26.肺癌之診斷可能性的確認

【0637】 使用上述的相同方法，使用取自肺癌患者的血液偵測到肺癌生物標記。圖155是使用取自151位肺癌患者的血漿的cfDNA分析肺癌患者的基因突變的表格。此外，肺癌患者的基因突變係藉由從無EGFR突變(野生型)患者、具有EGFR外顯子19缺失的患者及具有EGFR外顯子21 L858R的肺癌患者的血漿獲取cfDNA，使其與對EGFR外顯子19 Del具有特異性之探針混合，然後分析UV光譜的吸光度(ΔOD，500 nm至650 nm)的值來確認(圖156)。

【0638】 此外，從具有EGFR外顯子19缺失的肺癌患者的血漿獲取cfDNA，使其與對EGFR外顯子19 Del具有特異性之探針混合，然後分析基因突變的特異性與敏感性(圖157)。患者的基因突變係藉由從無EGFR突變(野生型)患者、具有EGFR外顯子19缺失的患者及具有EGFR外顯子21 L858R的肺癌患者的血漿獲取cfDNA，添加對EGFR外顯子21 L858R具有特異性之探針，然後分析UV光譜的吸光度(ΔOD，500 nm至650 nm)的值來確認(圖158)。此外，從具有EGFR外顯子21 L858R的肺癌患者的血漿獲取cfDNA，添加對EGFR外顯子21 L858R具有特異性之探針，然後分析患者基因突變的特異性與敏感性(圖159)。

【0639】 此外，顯示了EGFR外顯子19缺失的CP和DP的序列(圖160)。在此研究中，使用CP_1和DP分析肺癌患者的cfDNA基因突變。在此情況下，CP係設計成互補地結合至含有或毗鄰突變部分之序列的探針，DP係設計成互補地結合至與突變序列隔開之一部分的探針。

【0640】 此外，顯示了EGFR外顯子20 T790M的CP和DP的序列。在此研究

中，CP2和DP係用於分析肺癌患者的cfDNA基因突變(圖161)。

【0641】 此外，顯示了EGFR外顯子21 L858R的CP和DP的序列。在此研究中，CP2和DP係用於分析肺癌患者的cfDNA基因突變(圖162)。

【0642】 此外，cfDNA是否藉由顏色變化與UV吸光度被偵測係藉由使取自具有EGFR外顯子19缺失與EGFR外顯子20 T790M基因突變之肺癌患者的血漿的cfDNA和對EGFR外顯子19缺失(Del19)、EGFR外顯子20 T790M與EGFR外顯子21 L858R具有特異性之探針反應，然後添加HRP/鏈黴抗生物素蛋白奈米顆粒(包括大量HRP)來確認(圖163)。

【0643】 此外，圖164顯示了在使取自與圖47中相同之具有EGFR外顯子19缺失與EGFR外顯子20 T790M基因突變之肺癌患者的血漿的cfDNA和對EGFR外顯子19缺失(Del19)、EGFR外顯子20 T790M與EGFR外顯子21 L858R具有特異性之探針反應，然後添加HRP/鏈黴抗生物素蛋白複合物(HRP與鏈黴抗生物素蛋白以1:1結合的複合物)時，確認cfDNA是否藉由顏色變化與UV吸光度被偵測到的結果。確認了相較於HRP/鏈黴抗生物素蛋白奈米顆粒，雜訊是在HRP/鏈黴抗生物素蛋白複合物的情況下生成的。

【0644】 此外，圖165顯示了經由分析從具有EGFR外顯子19缺失與EGFR外顯子20 T790M基因突變之5位肺癌患者的血漿提取cfDNA，然後和對EGFR外顯子19 Del、EGFR外顯子20 T790M與EGFR外顯子21 L858R具有特異性之探針與HRP/鏈黴抗生物素蛋白奈米顆粒(HRP/st-帶標NPs)反應的結果以及和對EGFR外顯子19 Del、EGFR外顯子20 T790M與EGFR外顯子21 L858R具有特異性之探針與HRP/鏈黴抗生物素蛋白複合物(HRP與鏈黴抗生物素蛋白以1:1結合)反應的結果，確認並比對基因型與癌症組織之一致性的結果。

【0645】 此外，圖166顯示藉由UV吸光度確認了，當一次混合對EGFR外顯子19缺失(19 Del)、EGFR外顯子20 T790M、EGFR外顯子21 L858R與EGFR外顯

子L861Q具有特異性之探針與HRP/st-帶標NP以偵測取自具有EGFR外顯子20 T790M與EGFR外顯子21 L861Q基因突變之肺癌患者血漿的cfDNA的基因突變時，以癌症組織的相同方式僅在EGFR外顯子20 T790M與EGFR外顯子21 L861Q觀察到基因突變的結果。

【0646】 此外，圖167顯示確認了，當一次混合對ALK-EML4融合與ALK點突變(T1151、L1152P、L1152R、C1156Y、I1171N/T)具有特異性之探針與HRP/st-帶標NP以偵測取自具有ALK-EML4融合與ALK點突變(I1171N/T)基因突變之肺癌患者血漿的cfDNA的基因突變時，以癌症組織的相同方式偵測到ALK-EML4融合與ALK點突變(I1171N/T)基因型的結果。

【0647】 此外，圖168顯示確認了，藉由一次混合對BRAF V600E具有特異性之探針與HRP/st-帶標NP以偵測取自具有BRAF V600E基因突變之甲狀腺癌患者血漿的cfDNA的基因突變時，以患者基因型的相同方式偵測到BRAF V600E基因突變的結果。

IX. 根據樣本變性條件偵測衍生自癌症的cfDNA

範例27.取自癌症患者的根據溫度條件之樣本變性後的cfDNA的偵測

【0648】 進行實驗以確認根據樣本變性條件是否可區分衍生自癌症的cfDNA與衍生自正常人的cfDNA。具體而言，使用能夠偵測EGFR 19缺失的探針，在對收集自正常人與肺癌患者(0208-343、20190311_LC#1，組織結果：E19del)的血漿施加各種樣本變性條件之後，是否可區分不穩定cfDNA和穩定cfDNA係經確認。

【0649】 作為探針，使用了能夠偵測EGFR外顯子19的探針： ggaattaaga gaagcaacat ctcc (SEQ ID號105)。在此情況下，使用了結合有生物素的探針。使用了PEI/Ppy奈米線，並使用HRP/鏈黴抗生物素蛋白聚集的奈米顆粒作為標記。

【0650】 具體而言，在cfDNA物和奈米線被單離之前，在以下的各種條件

下處理樣本。樣本在30 °C下加熱15分鐘以及0分鐘。此外，其在60 °C下加熱5分鐘以及0分鐘。此外，其在95 °C下加熱1分鐘以及0分鐘。藉由上述方法進行其他步驟。

【0651】結果是，在無EGFR 19缺失突變的正常人中，在任何變性條件下皆未偵測到不穩定cfDNA (圖169)。然而，已確認在E19del患者中，在所有不同變性條件下皆偵測到不穩定cfDNA (圖170)。基於該等結果，有可能經由存在或不存在不穩定cfDNA來提供肺癌患者具有E19del突變的資訊。

範例28.根據溫度條件偵測衍生自癌細胞株之cfDNA

【0652】除了取自人體的樣本，進行實驗以確認存在於細胞株的突變的位置。具體而言，具有類似於cfDNA尺寸的fDNA是取自HCC2279 (外顯子19Del)、HCC827 (外顯子19Del)、H1975 (T790M、L858R)與A549 (EGFR野生型)。

【0653】結果是，確認了在95 °C的溫度下加熱1分鐘與0分鐘的變性條件下，僅有不穩定cfDNA藉由互補地結合至探針且結合至標記被偵測到(圖171)。基於該等結果，已證實不穩定cfDNA的存在或不存在甚至能在取自細胞株的樣本中確認。

範例29.根據DNase處理偵測衍生自癌症的cfDNA

【0654】為了不僅藉由溫度條件而亦藉由DNase確認衍生自癌細胞的不穩定cfDNA及穩定cfDNA是否具有差異，在不穩定cfDNA和穩定cfDNA經DNase處理之後，確認了對於和探針的反應性。在此情況下，該樣本不經歷使用高溫之變性。

【0655】具體而言，使用PEI/Ppy奈米線將取自HCC2279 (外顯子19Del)、HCC827 (外顯子19Del)、H1975 (T790M、L858R)與A549 (EGFR野生型)的fDNA懸浮在PBS中，然後以1 μL的DNase處理。在37 °C下處理60分鐘的結果是，確認了對於和探針的反應性而言，不穩定cfDNA和穩定cfDNA之間有差異(圖172)。此

外，確認了即使當以DNase在37 °C下處理60分鐘時，亦顯示相同效應(圖173)。基於該等結果，確認了穩定cfDNA不易被DNase酶降解。

【0656】 然而，以1 μL或2 μL的DNase在37 °C下處理120分鐘的結果是，確認了當處理時間增加或DNase的量增加時，穩定cfDNA亦和探針反應(圖174)。基於該等實驗結果，可確認不穩定cfDNA和穩定cfDNA之穩定性的差異。

【0657】 此外，為了根據DNase的活性確認不穩定cfDNA和穩定cfDNA之間的差異，以1 μL或2 μL的DNase在24 °C下處理120分鐘的結果係顯示於圖60。結果是，即使酶的活性在24 °C下降低了，亦確認了對於和探針的反應性而言，不穩定cfDNA和穩定cfDNA之間有差異(圖175)。

【0658】 此外，為了根據DNase的活性確認不穩定cfDNA和穩定cfDNA之間的差異，以1 μL或2 μL的DNase在3 °C下處理120分鐘的結果係顯示於圖58。結果是，即使酶的活性在3 °C下降低了，亦確認了對於和探針的反應性而言，不穩定cfDNA和穩定cfDNA之間有差異(圖176)。

序列表

<110> 南韓商健諾心理股份有限公司 (Genopsy Co., Ltd.)

<120> 使用cfDNA之癌症診斷方法

<140> TW 109111543
<141> 2020-04-06

<150> KO 10-2019-0039974
<151> 2019-04-05

<150> KO 10-2019-0157368
<151> 2019-11-29

<160> 166

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化PD-L1探針1(外顯子5)之核苷酸序列

<400> 1
tgggagccat cttattatgc c 21

<210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化PD-L1探針2(外顯子5)之核苷酸序列

<400> 2
cggaagatga atgtcagtgc 20

<210> 3
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化PD-L1探針3(外顯子2)之核苷酸序列

<400> 3
cctactggca tttgctgaac g 21

<210> 4
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化PD-L1探針4(外顯子3)之核苷酸序列

<400> 4
accatagctg atcatgcagc g 21

<210> 5
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化EpCAM探針1(外顯子1)之核苷酸序列

<400> 5
acagagcgct agtccttcgg c 21

<210> 6
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化EpCAM探針2(外顯子4)之核苷酸序列

<400> 6
aaccttatga tagtaaaagt t 21

<210> 7
<211> 21

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化EpCAM探針3(外顯子7)之核苷酸序列

<400> 7
ggtctaaaag ctggtgttat t 21

<210> 8
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化EpCAM探針4(外顯子9)之核苷酸序列

<400> 8
gaaactggct ttaccaatct t 21

<210> 9
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化FOLR1探針1(外顯子4)之核苷酸序列

<400> 9
tgttctacca acaccagcca g 21

<210> 10
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化FOLR1探針2(外顯子2)之核苷酸序列

<400> 10
actgaaccca aaggatcacc t 21

<210> 11
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化FOLR1探針3(外顯子1)之核苷酸序列

<400> 11
cctaggccac taaaccacag c 21

<210> 12
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化FOLR1探針4(外顯子5)之核苷酸序列

<400> 12
ggctgggccc tgggcagcct g 21

<210> 13
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化EGFR探針1(外顯子1)之核苷酸序列

<400> 13
aacgccacaa ccaccgcgca c 21

<210> 14
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化EGFR探針2(外顯子21)之核苷酸序列

<400> 14
ggaccgtcgc ttggtgcacc g 21

<210> 15
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化EGFR探針3(外顯子19)之核苷酸序列

<400> 15
tctggaccca gaaggtgaga a 21

<210> 16
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化EGFR探針4(外顯子20)之核苷酸序列

<400> 16
tgctgggcat ctgcctcacc t 21

<210> 17
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化ERBB2探針1(外顯子1)之核苷酸序列

<400> 17
tcgcagcacc ccgcgccccg c 21

<210> 18
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化ERBB2探針2(外顯子5)之核苷酸序列

<400> 18
cctgttctcc gatgtgtaag g 21

<210> 19
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化ERBB2探針3(外顯子10)之核苷酸序列

<400> 19
ccgctccagc cagagcagct c 21

<210> 20
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化ERBB2探針4(外顯子17)之核苷酸序列

<400> 20
aagatccgga agtacacgat g 21

<210> 21
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化OGT (O-GlcNAc轉移酶)探針1之核苷酸序列

<400> 21
atggcgtctt ccgtgggc 18

<210> 22
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 用於生物素化OGT (O-GlcNAc轉移酶)探針2之核苷酸序列

<400> 22
tgccctgtgg ccatggac 18

<210> 23
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化CEA (前列腺酸性磷酸酶；ACPP基因)探針1之核苷酸序列

<400> 23
aatctgaacc tctcctgcca c 21

<210> 24
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化CEA (前列腺酸性磷酸酶；ACPP基因)探針2之核苷酸序列

<400> 24
acccttcatc accagcaaca a 21

<210> 25
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化CEA (前列腺酸性磷酸酶；ACPP基因)探針3之核苷酸序列

<400> 25
tattcttggc tgattgatgg g 21

<210> 26
<211> 21
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化CEA (前列腺酸性磷酸酶；ACPP基因)探針4之核苷酸序列

<400> 26
cagcaacaac tccaaacccg t 21

<210> 27
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化PSA (KLK3)探針1之核苷酸序列

<400> 27
cagtctgcgg cggtgttctg g 21

<210> 28
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化PSA (KLK3)探針2之核苷酸序列

<400> 28
gcaagttcac cctcagaagg t 21

<210> 29
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化PSA (KLK3)探針3之核苷酸序列

<400> 29
gaggtccagg gttgctagga a 21

<210> 30

<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化CA19-9探針1之核苷酸序列

<400> 30
gatcatcacg gcacggtc 18

<210> 31
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化CA19-9探針2之核苷酸序列

<400> 31
gtgcagagag atcatcacgg c 21

<210> 32
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化CA19-9探針3之核苷酸序列

<400> 32
tctctcttac ctgggacctc a 21

<210> 33
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化C125 (MUC16基因)探針1之核苷酸序列

<400> 33
ctggaactga ttctatcaac c 21

<210> 34
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化C125 (MUC16基因)探針2之核苷酸序列

<400> 34
tgtggcagaa accagctatc c 21

<210> 35
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化C125 (MUC16基因)探針3之核苷酸序列

<400> 35
gaggtcctga ggatgtgtca t 21

<210> 36
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化AFP探針1之核苷酸序列

<400> 36
tgagtcagaa gtttaccaaa g 21

<210> 37
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化AFP探針2之核苷酸序列

<400> 37

tgcaaactga ccacgctgga a 21

<210> 38
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化AFP探針3之核苷酸序列

<400> 38
cttgaatgcc aagataaagg a 21

<210> 39
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化PSMA (FOLH1)探針1之核苷酸序列

<400> 39
catagtgctc ccttttgatt g 21

<210> 40
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化PSMA (FOLH1)探針2之核苷酸序列

<400> 40
agtggaaaga atttggcctg g 21

<210> 41
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化PSMA (FOLH1)探針3之核苷酸序列

<400> 41
acctagaaga acaattttgt t 21

<210> 42
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化PAP (前列腺酸性磷酸酶；ACPP基因)探針1之核苷酸序列

<400> 42
gcagcattat gaacttggag a 21

<210> 43
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化PAP (前列腺酸性磷酸酶；ACPP基因)探針2之核苷酸序列

<400> 43
tcggaatgag acgcagcacg a 21

<210> 44
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化PCA3 (前列腺癌抗原3；PCA3基因)探針1之核苷酸序列

<400> 44
cttagtgttt caatgaacac c 21

<210> 45
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 用於生物素化PCA3（前列腺癌抗原3；PCA3基因)探針2之核苷酸序列

<400> 45
gcttagcctt gtactgaggc t 21

<210> 46
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化NSE（神經元特異性烯醇酶；ENO2基因)探針1之核苷酸序列

<400> 46
ccatagagaa gatctgggcc c 21

<210> 47
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化NSE（神經元特異性烯醇酶；ENO2基因)探針2之核苷酸序列

<400> 47
gatcctccca gtgggagctg a 21

<210> 48
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化NSE（神經元特異性烯醇酶；ENO2基因)探針3之核苷酸序列

<400> 48
ggtcatggtg agtcatcgct c 21

<210> 49
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化SCC (鱗狀細胞癌抗原；SART3基因)探針1之核苷酸序列

<400> 49
gctggagtgg ctgcatgacg a 21

<210> 50
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化SCC (鱗狀細胞癌抗原；SART3基因)探針2之核苷酸序列

<400> 50
gcgccctggt cgagaactgc c 21

<210> 51
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化SCC (鱗狀細胞癌抗原；SART3基因)探針3之核苷酸序列

<400> 51
gtggctagag tattacaacc t 21

<210> 52
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化SCC (鱗狀細胞癌抗原；SART3基因)探針4之核苷酸序列

<400> 52
tcgagaacag catccctgca g 21

<210> 53
<211> 20

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化Cyfra21-1 (細胞角質蛋白19-片段；KRT19基因)探針1之核苷酸序列

<400> 53
ctggcctcct acctggacaa 20

<210> 54
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化Cyfra21-1 (細胞角質蛋白19-片段；KRT19基因)探針2之核苷酸序列

<400> 54
gacctggaga tgcagatcga a 21

<210> 55
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化Cyfra21-1 (細胞角質蛋白19-片段；KRT19基因)探針3之核苷酸序列

<400> 55
gtcgctggcc acacggagca g 21

<210> 56
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化TPA (組織型血纖維蛋白溶酶原活化因子；PLAT基因)探針1之核苷酸序列

<400> 56
gctgtgaagc aatcatggat g 21

<210> 57
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化TPA (組織型血纖維蛋白溶酶原活化因子；PLAT基因)探針2之核苷酸序列

<400> 57
gcacctgcca gcaggccctg t 21

<210> 58
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化TPA (組織型血纖維蛋白溶酶原活化因子；PLAT基因)探針3之核苷酸序列

<400> 58
actggacgga gtgtgagctc t 21

<210> 59
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化甲狀腺球蛋白(TG基因)探針1之核苷酸序列

<400> 59
caacaccaca gacatgatga t 21

<210> 60
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化甲狀腺球蛋白(TG基因)探針2之核苷酸序列

<400> 60
tgcggcctgg ctcgagcagc a 21

<210> 61
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化甲狀腺球蛋白(TG基因)探針3之核苷酸序列

<400> 61
aatcaatcac tatccagcca g 21

<210> 62
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化甲狀腺球蛋白(TG基因)探針4之核苷酸序列

<400> 62
actctctgga gcactccacg g 21

<210> 63
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化抑鈣素(抑鈣素基因相關肽；CALCA基因)探針1之核苷酸序列

<400> 63
gaggtgtcat gggcttccaa a 21

<210> 64
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化抑鈣素(抑鈣素基因相關肽；CALCA基因)探針2之核苷酸序列

<400> 64
gtaatctgag tacttgcatg c 21

<210> 65
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化FGFR3探針1之核苷酸序列

<400> 65
agtggcggtg gtggtgaggg ag 22

<210> 66
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化FGFR3探針2之核苷酸序列

<400> 66
cccacagctt ctgcccccga 20

<210> 67
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化FGFR3探針3之核苷酸序列

<400> 67
gggcatccat gggagcc 17

<210> 68
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化FGFR3探針4之核苷酸序列

<400> 68
cagcgtgggc cgaggt 16

<210> 69
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化FGFR3探針5之核苷酸序列

<400> 69
ccctgagatg ctgggagcag 20

<210> 70
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化FGFR3探針6之核苷酸序列

<400> 70
gtgtgggaag gcggtgttg 19

<210> 71
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化TP53探針1之核苷酸序列

<400> 71
gccctgactt tcaactctg 19

<210> 72
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化TP53探針2之核苷酸序列

<400> 72
acgacagggc tggttgcc 18

<210> 73
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化TP53探針3之核苷酸序列

<400> 73
tccccaggcc tctgattcc 19

<210> 74
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化TP53探針4之核苷酸序列

<400> 74
cctccaggtg agcagtag 18

<210> 75
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化TP53探針5之核苷酸序列

<400> 75
cttgggcctg tgttatctc 19

<210> 76
<211> 18
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化TP53探針6之核苷酸序列

<400> 76
cccacctctt accgattt 18

<210> 77
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化TP53探針7之核苷酸序列

<400> 77
acaagggtgg ttgggagtag 20

<210> 78
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化TP53探針8之核核苷酸序列

<400> 78
ggacaagaag cggtggagg 19

<210> 79
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化NMP22 (核基質蛋白-22；NUMA1基因)探針1之核苷酸序列

<400> 79
atggcactga agagggacag c 21

<210> 80

<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化NMP22 (核基質蛋白-22；NUMA1基因)探針2之核苷酸序列

<400> 80
gccaaggaag agctggagca g 21

<210> 81
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化NMP22 (核基質蛋白-22；NUMA1基因)探針3之核苷酸序列

<400> 81
gagcagctag aggtatttca g 21

<210> 82
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化NMP22 (核基質蛋白-22；NUMA1基因)探針4之核苷酸序列

<400> 82
aggtagaatc cctggagagt c 21

<210> 83
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化CA27.29/CA15-3 (癌抗原15-3；MUC1基因)探針1之核苷酸序列

<400> 83
gcgcctgcct gaatctgttc t 21

<210> 84
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化CA27.29/CA15-3 (癌抗原15-3；MUC1基因)探針2之核苷酸序列

<400> 84
ttctgggcct ctccaatatt a 21

<210> 85
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化CA27.29/CA15-3 (癌抗原15-3；MUC1基因)探針3之核苷酸序列

<400> 85
ggatacctac catcctatga g 21

<210> 86
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化生物素化乙型-HCG (人類絨毛膜促性腺激素；CGB基因)探針1之核苷酸序列

<400> 86
tgctgagcat gggcgggaca t 21

<210> 87
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化生物素化乙型-HCG (人類絨毛膜促性腺激素；CGB基因)探針2之核苷酸序列

<400> 87
tggctctcag ctgtcaatgt g 21

<210> 88
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化CPT1A探針1之核苷酸序列

<400> 88
gagccatgaa gctcttagac a 21

<210> 89
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化CPT1A探針2之核苷酸序列

<400> 89
cttccagaca tcgctgcctc g 21

<210> 90
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化CPT1A探針3之核苷酸序列

<400> 90
tggacaatac ctcggagcct c 21

<210> 91
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化CPT1A探針4之核苷酸序列

<400> 91

catgacccgg ctcttccgag a 21

<210> 92
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化IFN-伽瑪探針1之核苷酸序列

<400> 92
atcgtatatt gggagtacca g 21

<210> 93
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化IFN-伽瑪探針2之核苷酸序列

<400> 93
taaatggaga cgagcaggaa g 21

<210> 94
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化IFN-伽瑪探針3之核苷酸序列

<400> 94
tagtgcttag cctggtattc a 21

<210> 95
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化PD1探針1之核苷酸序列

<400> 95
gtaccgcatg agccccagca a 21

<210> 96
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化PD1探針2之核苷酸序列

<400> 96
gttccaaacc ctggtggttg g 21

<210> 97
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化PD1探針3之核苷酸序列

<400> 97
gagcagacgg agtatgccac 20

<210> 98
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化IFN-伽瑪受體探針1之核苷酸序列

<400> 98
atcgtatatt gggagtacca g 21

<210> 99
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化IFN-伽瑪受體探針2之核苷酸序列

<400> 99
taaatggaga cgagcaggaa g 21

<210> 100
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於生物素化IFN-伽瑪受體探針3之核苷酸序列

<400> 100
tagtgcttag cctggtattc a 21

<210> 101
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> HPV 16-CP

<400> 101
gaggaggagg atgaaataga tggt 24

<210> 102
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> HPV 16-DP

<400> 102
ttggaagacc tgttaatggg c 21

<210> 103
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> HPV 18-CP

<400> 103
cacattgtgg cacaatcttt ta 22

<210> 104
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> HPV 18-DP

<400> 104
gccatatcgc tttcatctgt 20

<210> 105
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFR 19-CP

<400> 105
ggaattaaga gaagcaacat ctcc 24

<210> 106
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFR 19-DP

<400> 106
aacctcaggc ccacctttt 19

<210> 107
<211> 21
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> EGFR 21-CP

<400> 107
ccaggaacgt actggtgaaa a 21

<210> 108
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFR 21-DP

<400> 108
ggaagagaaa gaataccatg ca 22

<210> 109
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFR外顯子19-探針1 CP1

<400> 109
ggaattaaga gaagcaacat ctcc 24

<210> 110
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFR外顯子19-探針1 DP

<400> 110
aacctcaggc ccacctttt 18

<210> 111

<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFR外顯子19-探針2 CP2

<400> 111
aaaattcccg tcgctatcaa g 21

<210> 112
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFR外顯子19-探針2 DP

<400> 112
aacctcaggc ccacctttt 19

<210> 113
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFR外顯子19-探針3 CP3

<400> 113
ggactctgga tcccagaagg tgag 24

<210> 114
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFR外顯子19-探針3 DP

<400> 114
aacctcaggc ccacctttt 19

<210> 115
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFR外顯子20-探針1 CP1

<400> 115
ccatgagtac gtattttgaa actc 24

<210> 116
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFR外顯子20-探針1 DP

<400> 116
gcaagagttt gccatgggga tatg 24

<210> 117
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFR外顯子20-探針2 CP2

<400> 117
ccaccgtgca gctcatcacg cagctca 27

<210> 118
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFR外顯子20-探針2 DP

<400> 118

gcaagagttt gccatgggga tatg 24

<210> 119
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFR外顯子20-探針3 CP3

<400> 119
gaagcctacg tgatggccag cgt 23

<210> 120
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFR外顯子20-探針3 DP

<400> 120
gcaagagttt gccatgggga tatg 24

<210> 121
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFR外顯子21-探針1 CP1

<400> 121
ccaggaacgt actggtgaaa a 21

<210> 122
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFR外顯子21-探針1 DP

<400> 122
ggaagagaaa gaataccatg ca 22

<210> 123
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFR外顯子21-探針2 CP2

<400> 123
aagatcacag attttgggcg gg 22

<210> 124
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFR外顯子21-探針2 DP

<400> 124
ggaagagaaa gaataccatg ca 22

<210> 125
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFR外顯子21-探針3 CP3

<400> 125
ggcatgaact acttggagga ccgt 24

<210> 126
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> EGFR外顯子21-探針3 DP

<400> 126
ggaagagaaa gaataccatg ca 22

<210> 127
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> KRAS 外顯子2-探針CP1

<400> 127
aaatgactga atataaactt g 21

<210> 128
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> KRAS 外顯子2-探針DP

<400> 128
gagtgccttg acgatacagc t 21

<210> 129
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> ALK-EML4變體1-探針CP2

<400> 129
tagagcccac acctgggaaa 20

<210> 130
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> ALK-EML4變體1-探針DP

<400> 130
cggagcttgc tcagcttgta 20

<210> 131
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> ALK-EML4變體3-探針CP3

<400> 131
gcataaagat gtcatcatca accaag 26

<210> 132
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> ALK-EML4變體3-探針DP

<400> 132
cggagcttgc tcagcttgta 20

<210> 133
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 正常細胞的BRCA1外顯子7

<400> 133
caaagtatgg gctacagaaa ccgtgccaaa ag 32

<210> 134
<211> 32

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 癌症細胞的BRCA1外顯子7

<400> 134
caaagtatgg gcttcagaaa ccgtgccaaa ag 32

<210> 135
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 正常細胞的BRCA1外顯子10

<400> 135
tgggaaaacc tatcggaaga aggcaagcct cc 32

<210> 136
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 癌症細胞的BRCA1外顯子10

<400> 136
tgggaaaacc tatcggtaga aggcaagcct cc 32

<210> 137
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 正常細胞的BRCA1外顯子11

<400> 137
ggggccaaga aattagagtc ctcagaagag 30

<210> 138
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 癌症細胞的BRCA1外顯子11

<400> 138
ggggccaaga aaattagagt cctcagaaga g 31

<210> 139
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 正常細胞的BRCA1外顯子15

<400> 139
atatacagga tatgcgaatt aagaagaaac aaa 33

<210> 140
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 癌症細胞的BRCA1外顯子15

<400> 140
atatacagga tatgtgaatt aagaagaaac aaa 33

<210> 141
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 正常細胞的TP53

<400> 141
taggaggccg agctctgttg cttcgaactc ca 32

<210> 142
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 癌症細胞的TP53

<400> 142
taggaggccg agctctttgc ttcgaactcc a 31

<210> 143
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 正常細胞的MSH2

<400> 143
tgaggaggtt tcgacatggc ggtgcagccg a 31

<210> 144
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 癌症細胞的MSH2

<400> 144
tgaggaggtt tcgacctggc ggtgcagccg a 31

<210> 145
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 正常細胞的EGFR

<400> 145
aaaaagatca aagtgctggg ctccggtgcg tt 32

<210> 146
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 癌症細胞的EGFR

<400> 146
aaaaagatca aagtgctgag ctccggtgcg tt 32

<210> 147
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 正常細胞的FGFR3

<400> 147
atcctctctc tgaaatcact gagcaggaga aag 33

<210> 148
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFR外顯子19缺失胺基酸序列

<400> 148
Gly Leu Trp Ile Pro Glu Gly Glu Lys Val Lys Ile Pro Val Ala Ile
1 5 10 15

Lys Glu Leu Arg Glu Ala Thr Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu
20 25 30

Asp

<210> 149
<211> 120
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 外顯子19缺失

<400> 149
gcagcatgtg gcaccatctc acaattgcca gttaacgtct tccttctctc tctgtcatag 60

gtgagtttct gctttgctgt gtgggggtcc atggctctga acctcaggcc caccttttct 120

120

<210> 150
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CP_!

<400> 150
ggaattaaga gaagcaacat ctcc 24

<210> 151
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> DP_1

<400> 151
aaaaggtggg cctgaggtt 19

<210> 152
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CP_2

<400> 152
aaaattcccg tcgctatcaa g 21

<210> 153
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CP_3

<400> 153
ggactctgga tcccagaagg tgag 24

<210> 154
<211> 238
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 外顯子19缺失

<400> 154
agggactctg gatcccagaa ggtgagaaag ttaaaattcc cgtcgctatc aaggaattaa 60

gagaagcaac atctccgaaa gccaacaagg aaatcctcga tgtgagtttc tgctttgctg 120

tgtgggggtc catggctctg aacctcaggc ccacctttc tcatgtctgg cagctgctct 180

gctctagacc ctgctcatct ccacatccta aatgttcact ttctatgtct ttcccttt 238

<210> 155
<211> 658
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFR外顯子20 T790M

<400> 155
ccagatgcac ccaggagggg ccctctccca ctgcatctgt cacttcacag ccctgcgtaa 60

acgtccctgt gctaggtctt ttgcaggcac agcttttcct ccatgagtac gtattttgaa 120

actcaagatc gcattcatgc gtcttcacct ggaaggggtc catgtgcccc tccttctggc 180

caccatgcga agccacactg acgtgcctct ccctccctcc aggaagccta cgtgatggcc 240

agcgtggaca acccccacgt gtgccgcctg ctgggcatct gcctcacctc caccgtgcag 300

ctcatcacgc agctcatgcc cttcggctgc ctcctggact atgtccggga acacaaagac 360

aatattggct cccagtacct gctcaactgg tgtgtgcaga tcgcaaaggt aatcagggaa 420

gggagatacg gggaggggag ataaggagcc aggatcctca catgcggtct gcgctcctgg 480

gatagcaaga gtttgccatg gggatatgtg tgtgcgtgca tgcagcacac acacattcct 540

ttattttgga ttcaatcaag ttgatcttct tgtgcacaaa tcagtgcctg tcccatctgc 600

atgtggaaac tctcatcaat cagctacctt tgaagaattt tctctttatt gagtgctc 658

<210> 156
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CP1

<400> 156
ccatgagtac gtattttgaa actc 24

<210> 157
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> DP1

<400> 157
catatcccca tggcaaactc ttgc 24

<210> 158
<211> 22
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> CP2

<400> 158
ccaccgtgca gctcatcatg ca 22

<210> 159
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CP3

<400> 159
gaagcctacg tgatggccag cgt 23

<210> 160
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFR外顯子21 L858R

<400> 160
gtcaagatca cagattttgg gctggccaaa ctgctg 36

<210> 161
<211> 156
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> EGFR外顯子21 L858R

<400> 161
ggcatgaact acttggagga ccgtcgcttg gtgcaccgcg acctggcagc caggaacgta 60

ctggtgaaaa caccgcagca tgtcaagatc acagattttg ggctggccaa actgctgggt 120

gcggaagaga aagaatacca tgcagaagga ggcaaa 156

<210> 162
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CP1

<400> 162
ccaggagcgt actggtgaaa a 21

<210> 163
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> DP

<400> 163
ggaagagaaa gaataccatg ca 22

<210> 164
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CP2

<400> 164
aagatcacag attttgggcg gg 22

<210> 165
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CP3

<400> 165
ggcatgaact acttggagga ccgt 24

<210> 166
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 癌症細胞的FGFR3

<400> 166
atcctctctc tgaaatcact gcgcaggaga aag 33

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種用於診斷前列腺癌的方法，其藉由在不擴增之下偵測衍生自來自一樣本的前列腺癌細胞之一基因，其中該方法包含

a)將單離自一個體之包含游離DNA (下稱cfDNA)的一生物樣本與一帶正電材料混合的一步驟；

b)單離結合有cfDNA之該帶正電材料的一步驟；

c)在混合物中依序地或同時地混合具有互補於該cfDNA的一序列之一探針與一標記的一步驟；

d)移除未結合至cfDNA之該探針與該標記的一步驟；及

e)偵測該標記的一步驟，

其中該cfDNA係衍生自前列腺癌細胞，及

具有互補於cfDNA的一序列之該探針係互補地結合至已知為一前列腺癌生物標記之一基因。

【請求項2】 如請求項1之用於診斷前列腺癌的方法，其特徵在於，衍生自前列腺癌細胞之該cfDNA

i)具有比起具有衍生自正常細胞的一雙螺旋結構之cfDNA所具者較低之一Tm值，或

ii)在具有衍生自正常細胞的一雙螺旋結構之該cfDNA不變性之一條件下變性。

【請求項3】 如請求項1之用於診斷前列腺癌的方法，其中衍生自前列腺癌細胞之該cfDNA能夠在下列條件中之任一者與互補地結合至cfDNA之15聚體至30聚體探針結合：

i)在周遭溫度下靜置1分鐘至120分鐘的條件；

ii)在90 °C至95 °C下加熱1秒至3分鐘的條件；

iii)在75 °C至90 °C下加熱1秒至5分鐘的條件；

iv)在60 °C至75 °C下加熱30秒至30分鐘的條件；

v)在25 °C至40 °C下加熱10分鐘至120分鐘的條件；

vi)以蛋白酶處理1分鐘至30分鐘的條件；

vii)以DNase處理1分鐘至30分鐘的條件；及

viii)以化學物質(例如氫氧化鈉、DMSO、表面活性劑等)處理的條件。

【請求項4】 如請求項1之用於診斷前列腺癌的方法，其中衍生自前列腺癌細胞之該cfDNA是衍生自前列腺癌細胞之循環腫瘤DNA。

【請求項5】 如請求項4之用於診斷前列腺癌的方法，其中具有互補於cfDNA的一序列之該探針係互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*KLK3*、*FOLH1*、*PCA3*、*PDE4D7*、*SFMBT2*、*EFEMP1*、*RETN*、*ACADL*、*AGR2*、*COL1A1*、*FAM13C*、*GPX8*、*GRHL2*、*HNF1A*、*HOXB13*、*KLK2*、*MYBPC1*、*NR0B1*、*PITX2*、*SFRP4*、*SLCO1B3*、*TMEFF2*、*TMPRSS2-ERG*、及其之組合。

【請求項6】 如請求項1之用於診斷前列腺癌的方法，其特徵在於，該方法更包含在上述步驟c)前，在下列條件中之任一者使結合至該帶正電材料之該樣本或cfDNA變性的一步驟：

i)在周遭溫度下靜置1分鐘至10分鐘的條件；

ii)在90 °C至95 °C下加熱1秒至1分鐘的條件；

iii)在75 °C至90 °C下加熱10秒至3分鐘的條件；

v)在60 °C至75 °C下加熱1分鐘至30分鐘的條件；

v)在25 °C至40 °C下加熱5分鐘至60分鐘的條件；

vi)以蛋白酶處理1分鐘至10分鐘的條件；

vii)以DNase處理1分鐘至10分鐘的條件；及

viii)以化學物質(例如氫氧化鈉、DMSO、表面活性劑等)處理的條件。

【請求項7】 如請求項1之用於診斷前列腺癌的方法，其中該樣本是選自由下列組成之群組中之任一者：尿液、腦脊髓液、血漿、血液、肋膜積液、腹水、唾液、痰、及體液。

【請求項8】 如請求項1之用於診斷前列腺癌的方法，其中該帶正電材料是一帶正電奈米線。

【請求項9】 如請求項8之用於診斷前列腺癌的方法，其中該奈米線包含一導電聚合物。

【請求項10】 如請求項9之用於診斷前列腺癌的方法，其中該奈米線更包含生物素。

【請求項11】 如請求項9之用於診斷前列腺癌的方法，其中該導電聚合物選自由下列組成之群組中之任一者：聚(乙炔)、聚(吡咯)、聚(噻吩)、聚(對苯)、聚(3,4-乙烯二氧基噻吩)、聚(苯硫醚)、聚(對苯伸乙烯)、及聚苯胺。

【請求項12】 如請求項1之用於診斷前列腺癌的方法，其中該探針是由15聚體至30聚體之核苷酸構成。

【請求項13】 如請求項1之用於診斷前列腺癌的方法，其中至少一個生物素係結合至該探針。

【請求項14】 如請求項1之用於診斷前列腺癌的方法，其中該標記是選自由下列組成之群組中之任一者：量子點、HRP (辣根過氧化酶)、螢光蛋白、磷光體、鹼性磷酸酶、及螢光素酶。

【請求項15】 如請求項14之用於診斷前列腺癌的方法，其中一基於抗生物素蛋白之蛋白質係結合至該標記。

【請求項16】 如請求項14之用於診斷前列腺癌的方法，其中該基於抗生物素蛋白之蛋白質是選自由下列組成之群組中之任一者：抗生物素蛋白、鏈黴抗生物素蛋白、及其之組合。

【請求項17】　如請求項1之用於診斷前列腺癌的方法，其中該標記是包含一導電聚合物；玻尿酸；抗生物素蛋白或鏈黴抗生物素蛋白；及一HRP(辣根過氧化酶)或螢光蛋白的奈米顆粒。

【請求項18】　如請求項1之用於診斷前列腺癌的方法，其中該cfDNA更包含由選自由下列組成之群組中之至少任一基因所衍生之一者：*ACPP*、*CPT1A*、*IFNG*、*CD274*、*FOLR1*、*EPCAM*、*OGT*、及其之組合。

【請求項19】　如請求項1之用於診斷前列腺癌的方法，其中該標記是在步驟e)中藉由顏色變化、UV吸光度變化、螢光變化、或電化學變化來偵測。

【請求項20】　一種用於診斷前列腺癌的診斷套組，包含

一結合有生物素的探針，該探針互補地結合至前列腺癌中特異地表現之一基因；

一帶正電材料；

結合有一基於抗生物素蛋白之蛋白質的一標記；及

一手冊，

其中該手冊說明了該套組係構設成能夠在無基因擴增之下藉由下列流程來診斷前列腺癌：

a)使用該套組內含的一帶正電材料來單離cfDNA，該cfDNA係來自單離自一個體之一生物樣本；b)在該單離之cfDNA中依序地或同時地混合該套組內含的一結合有生物素的探針與該套組內含的一標記；c)移除未結合至cfDNA之該探針與該標記；及d)偵測該標記的信號。

【請求項21】　如請求項20之診斷套組，其中前列腺癌中特異地表現之該基因是選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*KLK3*、*FOLH1*、*PCA3*、*PDE4D7*、*SFMBT2*、*EFEMP1*、*RETN*、*ACADL*、*AGR2*、*COL1A1*、*FAM13C*、*GPX8*、*GRHL2*、*HNF1A*、*HOXB13*、*KLK2*、*MYBPC1*、*NR0B1*、*PITX2*、*SFRP4*、

SLCO1B3、*TMEFF2*、*TMPRSS2-ERG*、及其之組合。

【請求項22】　如請求項20之診斷套組，其中該套組更包含一結合有生物素的探針，該探針互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*ACPP*、*CPT1A*、*IFNG*、*CD274*、*FOLR1*、*EPCAM*、*OGT*、及其之組合。

【請求項23】　如請求項20之診斷套組，其中該帶正電材料是一帶正電奈米線。

【請求項24】　如請求項23之診斷套組，其中該奈米線包含一導電聚合物。

【請求項25】　如請求項24之診斷套組，其中該奈米線更包含生物素。

【請求項26】　如請求項24之診斷套組，其中該導電聚合物選自由下列組成之群組中之任一者：聚(乙炔)、聚(吡咯)、聚(噻吩)、聚(對苯)、聚(3,4-乙烯二氧基噻吩)、聚(苯硫醚)、聚(對苯伸乙烯)、及聚苯胺。

【請求項27】　如請求項20之診斷套組，其中該標記是包含一導電聚合物；玻尿酸；抗生物素蛋白或鏈黴抗生物素蛋白；及一HRP (辣根過氧化酶)或一螢光蛋白的一奈米顆粒。

【請求項28】　一種用於診斷前列腺癌的裝置，其藉由在不擴增之下偵測衍生自來自一樣本的前列腺癌細胞之一基因，其中該裝置包含

a)一混合部件，用於將單離自一個體之包含cfDNA的一生物樣本與一帶正電材料混合；

b)一獲取部件，用於移除除結合有cfDNA之該帶正電材料外之該樣本；

c)一反應部件，用於依序地或同時地將一結合有生物素之能夠互補地結合至前列腺癌中特異地表現之基因的探針；及包含鏈黴抗生物素蛋白與一標記的一奈米顆粒添加至結合有cfDNA之該帶正電材料；

d)一偵測部件，用於偵測該標記；及

e)一資訊處理部件，用於取決於是否偵測到該標記來判定該樣本中是否存在

具有互補於該探針且衍生自前列腺癌的一序列之cfDNA。

【請求項29】　如請求項28之用於診斷前列腺癌的裝置，其中前列腺癌中特異地表現之該基因更包含一結合有生物素的探針，該探針係互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*KLK3*、*FOLH1*、*PCA3*、*PDE4D7*、*SFMBT2*、*EFEMP1*、*RETN*、*ACADL*、*AGR2*、*COL1A1*、*FAM13C*、*GPX8*、*GRHL2*、*HNF1A*、*HOXB13*、*KLK2*、*MYBPC1*、*NR0B1*、*PITX2*、*SFRP4*、*SLCO1B3*、*TMEFF2*、*TMPRSS2-ERG*、及其之組合。

【請求項30】　如請求項29之用於診斷前列腺癌的裝置，其中該裝置更包含一結合有生物素的探針，該探針係互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*ACPP*、*CPT1A*、*IFNG*、*CD274*、*FOLR1*、*EPCAM*、*OGT*、及其之組合。

【請求項31】　一種用於診斷肺癌的方法，其藉由在不擴增之下偵測衍生自來自一樣本的肺癌細胞之一基因，其中該方法包含

a)將單離自一個體之包含游離DNA (下稱cfDNA)的一生物樣本與一帶正電材料混合的一步驟；

b)單離結合有cfDNA之該帶正電材料的一步驟；

c)在混合物中依序地或同時地混合具有互補於該cfDNA的一序列之一探針與一標記的一步驟；

d)移除未結合至cfDNA之該探針與該標記的一步驟；及

e)偵測該標記的一步驟，

其中該cfDNA係衍生自肺癌細胞，及

具有互補於cfDNA的一序列之該探針係互補地結合至已知為一肺癌生物標記之一基因。

【請求項32】　如請求項31之用於診斷肺癌的方法，其特徵在於，衍生自肺

癌細胞之該cfDNA

i)具有比起具有衍生自正常細胞的一雙螺旋結構之cfDNA所具者較低之一Tm值，或

ii)在具有衍生自正常細胞的一雙螺旋結構之該cfDNA不變性之一條件下變性。

【請求項33】　如請求項31之用於診斷肺癌的方法，其中衍生自肺癌細胞之該cfDNA能夠在下列條件中之任一者與互補地結合至cfDNA之15聚體至30聚體探針結合：

i)在周遭溫度下靜置1分鐘至120分鐘的條件；

ii)在90 °C至95 °C下加熱1秒至3分鐘的條件；

iii)在75 °C至90 °C下加熱1秒至5分鐘的條件；

iv)在60 °C至75 °C下加熱30秒至30分鐘的條件；

v)在25 °C至40 °C下加熱10分鐘至120分鐘的條件；

vi)以蛋白酶處理1分鐘至30分鐘的條件；

vii)以DNase處理1分鐘至30分鐘的條件；及

viii)以化學物質(例如氫氧化鈉、DMSO、表面活性劑等)處理的條件。

【請求項34】　如請求項31之用於診斷肺癌的方法，其中衍生自肺癌細胞之該cfDNA是衍生自肺癌細胞之循環腫瘤DNA。

【請求項35】　如請求項34之用於診斷肺癌的方法，其中具有互補於cfDNA的一序列之該探針係互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*SART3*、*PLAT*、*ALK*、*ROS1*、*PI3K*、*S100P*、*CDCA7*、*S100A2*、*ETV4*、及其之組合。

【請求項36】　如請求項31之用於診斷肺癌的方法，其特徵在於，該方法更包含在上述步驟c)前，在下列條件中之任一者使結合至該帶正電材料之該樣本或

cfDNA變性的一步驟：

i)在周遭溫度下靜置1分鐘至10分鐘的條件；

ii)在90 °C至95 °C下加熱1秒至1分鐘的條件；

iii)在75 °C至90 °C下加熱10秒至3分鐘的條件；

v)在60 °C至75 °C下加熱1分鐘至30分鐘的條件；

v)在25 °C至40 °C下加熱5分鐘至60分鐘的條件；

vi)以蛋白酶處理1分鐘至10分鐘的條件；

vii)以DNase處理1分鐘至10分鐘的條件；及

viii)以化學物質(例如氫氧化鈉、DMSO、表面活性劑等)處理的條件。

【請求項37】　如請求項31之用於診斷肺癌的方法，其中該樣本是選自由下列組成之群組中之任一者：尿液、腦脊髓液、血漿、血液、肋膜積液、腹水、唾液、痰、及體液。

【請求項38】　如請求項31之用於診斷肺癌的方法，其中該帶正電材料是一帶正電奈米線。

【請求項39】　如請求項38之用於診斷肺癌的方法，其中該奈米線包含一導電聚合物。

【請求項40】　如請求項39之用於診斷肺癌的方法，其中該奈米線更包含生物素。

【請求項41】　如請求項39之用於診斷肺癌的方法，其中該導電聚合物選自由下列組成之群組中之任一者：聚(乙炔)、聚(吡咯)、聚(噻吩)、聚(對苯)、聚(3,4-乙烯二氧基噻吩)、聚(苯硫醚)、聚(對苯伸乙烯)、及聚苯胺。

【請求項42】　如請求項31之用於診斷肺癌的方法，其中該探針是由15聚體至30聚體之核苷酸構成。

【請求項43】　如請求項31之用於診斷肺癌的方法，其中至少一個生物素

係結合至該探針。

【請求項44】　如請求項31之用於診斷肺癌的方法，其中該標記是選自由下列組成之群組中之任一者：量子點、HRP (辣根過氧化酶)、螢光蛋白、磷光體、鹼性磷酸酶、及螢光素酶。

【請求項45】　如請求項44之用於診斷肺癌的方法，其中一基於抗生物素蛋白之蛋白質係結合至該標記。

【請求項46】　如請求項44之用於診斷肺癌的方法，其中該基於抗生物素蛋白之蛋白質是選自由下列組成之群組中之任一者：抗生物素蛋白、鏈黴抗生物素蛋白、及其之組合。

【請求項47】　如請求項31之用於診斷肺癌的方法，其中該標記是包含一導電聚合物；玻尿酸；抗生物素蛋白或鏈黴抗生物素蛋白；及一HRP (辣根過氧化酶)或一螢光蛋白的一奈米顆粒。

【請求項48】　如請求項31之用於診斷肺癌的方法，其中該cfDNA更包含由選自由下列組成之群組中之至少任一基因所衍生之一者：*ENO2*、*ACPP*、*KRT19*、*EGFR*、*KRAS*、*RET*、*ERBB2*、*MMP11*、*TOP2A*、*UBE2C*、*CPT1A*、*IFNG*、*CD279*、*CD274*、*ERBB2*、*EGFR*、*FOLR1*、*EPCAM*、及其之組合。

【請求項49】　如請求項31之用於診斷肺癌的方法，其中該標記是在步驟e)中藉由顏色變化、UV吸光度變化、螢光變化、或電化學變化來偵測。

【請求項50】　一種用於診斷肺癌的診斷套組，包含

一結合有生物素的探針，該探針互補地結合至肺癌中特異地表現之一基因；

一帶正電材料；

結合有一基於抗生物素蛋白之蛋白質的一標記；及

一手冊，

其中該手冊說明了該套組係構設成能夠在無基因擴增之下藉由下列流程來

診斷肺癌：

a)使用該套組內含的一帶正電材料來單離cfDNA，該cfDNA係來自單離自一個體之一生物樣本；b)在該單離之cfDNA中依序地或同時地混合該套組內含的一結合有生物素的探針與該套組內含的一標記；c)移除未結合至cfDNA之該探針與該標記；及d)偵測該標記的信號。

【請求項51】　如請求項50之診斷套組，其中肺癌中特異地表現之該基因是選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*SART3*、*PLAT*、*ALK*、*ROS1*、*PI3K*、*S100P*、*CDCA7*、*S100A2*、*ETV4*、及其之組合。

【請求項52】　如請求項50之診斷套組，其中該套組更包含一結合有生物素的探針，該探針互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*ENO2*、*ACPP*、*KRT19*、*EGFR*、*KRAS*、*RET*、*ERBB2*、*MMP11*、*TOP2A*、*UBE2C*、*CPT1A*、*IFNG*、*CD279*、*CD274*、*ERBB2*、*EGFR*、*FOLR1*、*EPCAM*、及其之組合。

【請求項53】　如請求項50之診斷套組，其中該帶正電材料是一帶正電奈米線。

【請求項54】　如請求項53之診斷套組，其中該奈米線包含一導電聚合物。

【請求項55】　如請求項54之診斷套組，其中該奈米線更包含生物素。

【請求項56】　如請求項53之診斷套組，其中該導電聚合物選自由下列組成之群組中之任一者：聚(乙炔)、聚(吡咯)、聚(噻吩)、聚(對苯)、聚(3,4-乙烯二氧基噻吩)、聚(苯硫醚)、聚(對苯伸乙烯)、及聚苯胺。

【請求項57】　如請求項50之診斷套組，其中該標記是包含一導電聚合物；玻尿酸；抗生物素蛋白或鏈黴抗生物素蛋白；及一HRP (辣根過氧化酶)或一螢光蛋白的一奈米顆粒。

【請求項58】　一種用於診斷肺癌的裝置，其藉由在不擴增之下偵測衍生

自來自一樣本的肺癌細胞之一基因，其中該裝置包含

a)一混合部件，用於將單離自一個體之包含cfDNA的一生物樣本與一帶正電材料混合；

b)一獲取部件，用於移除除結合有cfDNA之該帶正電材料外之該樣本；

c)一反應部件，用於依序地或同時地將一結合有生物素之能夠互補地結合至肺癌中特異地表現之基因的探針；及包含鏈黴抗生物素蛋白與一標記的一奈米顆粒添加至結合有cfDNA之該帶正電材料；

d)一偵測部件，用於偵測該標記；及

e)一資訊處理部件，用於取決於是否偵測到該標記來判定該樣本中是否存在具有互補於該探針且衍生自肺癌的一序列之cfDNA。

【請求項59】　如請求項58之用於診斷肺癌的裝置，其中肺癌中特異地表現之該基因更包含一結合有生物素的探針，該探針係互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*SART3*、*PLAT*、*ALK*、*ROS1*、*PI3K*、*S100P*、*CDCA7*、*S100A2*、*ETV4G*、及其之組合。

【請求項60】　如請求項59之用於診斷肺癌的裝置，其中該裝置更包含一結合有生物素的探針，該探針係互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*ENO2*、*ACPP*、*KRT19*、*EGFR*、*KRAS*、*RET*、*ERBB2*、*MMP11*、*TOP2A*、*UBE2C*、*CPT1A*、*IFNG*、*CD279*、*CD274*、*ERBB2*、*EGFR*、*FOLR1*、*EPCAM*、及其之組合。

【請求項61】　一種用於診斷甲狀腺癌的方法，該方法是藉由在不擴增之下偵測由來自一樣本的甲狀腺癌細胞所衍生之一基因，其中該方法包含

a)將單離自一個體之包含游離DNA (下稱cfDNA)的一生物樣本與一帶正電材料混合的一步驟；

b)單離結合有cfDNA之該帶正電材料的一步驟；

c)在混合物中依序地或同時地混合具有互補於該cfDNA的一序列之一探針與一標記的一步驟；

d)移除未結合至cfDNA之該探針與該標記的一步驟；及

e)偵測該標記的一步驟，

其中該cfDNA係衍生自甲狀腺癌細胞，及

具有互補於cfDNA的一序列之該探針係互補地結合至已知為一甲狀腺癌生物標記之一基因。

【請求項62】　如請求項61之用於診斷甲狀腺癌的方法，其特徵在於，衍生自甲狀腺癌細胞之該cfDNA

i)具有比起具有衍生自正常細胞的一雙螺旋結構之cfDNA所具者較低之一Tm值，或

ii)在具有衍生自正常細胞的一雙螺旋結構之該cfDNA不變性之一條件下變性。

【請求項63】　如請求項61之用於診斷甲狀腺癌的方法，其中衍生自甲狀腺癌細胞之該cfDNA能夠在下列條件中之任一者與互補地結合至cfDNA之15聚體至30聚體探針結合：

i)在周遭溫度下靜置1分鐘至120分鐘的條件；

ii)在90 °C至95 °C下加熱1秒至3分鐘的條件；

iii)在75 °C至90 °C下加熱1秒至5分鐘的條件；

iv)在60 °C至75 °C下加熱30秒至30分鐘的條件；

v)在25 °C至40 °C下加熱10分鐘至120分鐘的條件；

vi)以蛋白酶處理1分鐘至10分鐘的條件；

vii)以DNase處理1分鐘至10分鐘的條件；及

viii)以化學物質(例如氫氧化鈉、DMSO、表面活性劑等)處理的條件。

【請求項64】　如請求項61之用於診斷甲狀腺癌的方法，其中衍生自甲狀腺癌細胞之該cfDNA是衍生自甲狀腺癌細胞之循環腫瘤DNA。

【請求項65】　如請求項64之用於診斷甲狀腺癌的方法，其中具有互補於cfDNA的一序列之該探針係互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*TG*、*CALCA*、*APOC1*、*HIG2* 、及其之組合。

【請求項66】　如請求項61之用於診斷甲狀腺癌的方法，其特徵在於，該方法更包含在上述步驟c)前，在下列條件中之任一者使結合至該帶正電材料之該樣本或cfDNA變性的一步驟：

i)在周遭溫度下靜置1分鐘至10分鐘的條件；

ii)在90 °C至95 °C下加熱1秒至1分鐘的條件；

iii)在75 °C至90 °C下加熱10秒至3分鐘的條件；

v)在60 °C至75 °C下加熱1分鐘至30分鐘的條件；

v)在25 °C至40 °C下加熱5分鐘至60分鐘的條件；

vi)以蛋白酶處理1分鐘至10分鐘的條件；

vii)以DNase處理1分鐘至10分鐘的條件；及

viii)以化學物質(例如氫氧化鈉、DMSO、表面活性劑等)處理的條件。

【請求項67】　如請求項61之用於診斷甲狀腺癌的方法，其中該樣本是選自由下列組成之群組中之任一者：尿液、腦脊髓液、血漿、血液、肋膜積液、腹水、唾液、痰、及體液。

【請求項68】　如請求項61之用於診斷甲狀腺癌的方法，其中該帶正電材料是一帶正電奈米線。

【請求項69】　如請求項68之用於診斷甲狀腺癌的方法，其中該奈米線包含一導電聚合物。

【請求項70】　如請求項69之用於診斷甲狀腺癌的方法，其中該奈米線更

包含生物素。

【請求項71】　如請求項69之用於診斷甲狀腺癌的方法，其中該導電聚合物選自由下列組成之群組中之任一者：聚(乙炔)、聚(吡咯)、聚(噻吩)、聚(對苯)、聚(3,4-乙烯二氧基噻吩)、聚(苯硫醚)、聚(對苯伸乙烯)、及聚苯胺。

【請求項72】　如請求項61之用於診斷甲狀腺癌的方法，其中該探針是由15聚體至30聚體之核苷酸構成。

【請求項73】　如請求項61之用於診斷甲狀腺癌的方法，其中至少一個生物素係結合至該探針。

【請求項74】　如請求項61之用於診斷甲狀腺癌的方法，其中該標記是選自由下列組成之群組中之任一者：量子點、HRP (辣根過氧化酶)、螢光蛋白、磷光體、鹼性磷酸酶、及螢光素酶。

【請求項75】　如請求項74之用於診斷甲狀腺癌的方法，其中一基於抗生物素蛋白之蛋白質係結合至該標記。

【請求項76】　如請求項74之用於診斷甲狀腺癌的方法，其中該基於抗生物素蛋白之蛋白質是選自由下列組成之群組中之任一者：抗生物素蛋白、鏈黴抗生物素蛋白、及其之組合。

【請求項77】　如請求項61之用於診斷甲狀腺癌的方法，其中該標記是包含一導電聚合物；玻尿酸；抗生物素蛋白或鏈黴抗生物素蛋白；及一HRP (辣根過氧化酶)或一螢光蛋白的一奈米顆粒。

【請求項78】　如請求項61之用於診斷甲狀腺癌的方法，其中該cfDNA更包含由選自由下列組成之群組中之至少任一基因所衍生之一者：*ENO2*、*ACPP*、*TYRO3*、*CPT1A*、*IFNG*、*CD279*、*CD274*、*ERBB2*、*EGFR*、*FOLR1*、*EPCAM*、及其之組合。

【請求項79】　如請求項61之用於診斷甲狀腺癌的方法，其中該標記是在

步驟e)中藉由顏色變化、UV吸光度變化、螢光變化、或電化學變化來偵測。

【請求項80】　一種用於診斷甲狀腺癌的診斷套組，包含

一結合有生物素的探針，該探針互補地結合至甲狀腺癌中特異地表現之一基因；

一帶正電材料；

結合有一基於抗生物素蛋白之蛋白質的一標記；及

一手冊，

其中該手冊說明了該套組係構設成能夠在無基因擴增之下藉由下列流程來診斷甲狀腺癌：

a)使用該套組內含的一帶正電材料來單離cfDNA，該cfDNA係來自單離自一個體之一生物樣本；b)在該單離之cfDNA中依序地或同時地混合該套組內含的一結合有生物素的探針與該套組內含的一標記；c)移除未結合至cfDNA之該探針與該標記；及d)偵測該標記的信號。

【請求項81】　如請求項80之診斷套組，其中甲狀腺癌中特異地表現之該基因是選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*TG*、*CALCA*、*APOC1*、*HIG2*、及其之組合。

【請求項82】　如請求項80之診斷套組，其中該套組更包含一結合有生物素的探針，該探針互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*EENO2*、*ACPP*、*TYRO3*、*CPT1A*、*IFNG*、*CD279*、*CD274*、*ERBB2*、*EGFR*、*FOLR1*、*EPCAM*、及其之組合。

【請求項83】　如請求項80之診斷套組，其中該帶正電材料是一帶正電奈米線。

【請求項84】　如請求項83之診斷套組，其中該奈米線包含一導電聚合物。

【請求項85】　如請求項84之診斷套組，其中該奈米線更包含生物素。

【請求項86】　如請求項83之診斷套組，其中該導電聚合物選自由下列組成之群組中之任一者：聚(乙炔)、聚(吡咯)、聚(噻吩)、聚(對苯)、聚(3,4-乙烯二氧基噻吩)、聚(苯硫醚)、聚(對苯伸乙烯)、及聚苯胺。

【請求項87】　如請求項80之診斷套組，其中該標記是包含一導電聚合物；玻尿酸；抗生物素蛋白或鏈黴抗生物素蛋白；及一HRP (辣根過氧化酶)或一螢光蛋白的一奈米顆粒。

【請求項88】　一種用於診斷甲狀腺癌的裝置，其藉由在不擴增之下偵測衍生自來自一樣本的甲狀腺癌細胞之一基因，其中該裝置包含

a)一混合部件，用於將單離自一個體之包含cfDNA的一生物樣本與一帶正電材料混合；

b)一獲取部件，用於移除除結合有cfDNA之該帶正電材料外之該樣本；

c)一反應部件，用於依序地或同時地將一結合有生物素之能夠互補地結合至甲狀腺癌中特異地表現之基因的探針；及包含鏈黴抗生物素蛋白與一標記的一奈米顆粒添加至結合有cfDNA之該帶正電材料；

d)一偵測部件，用於偵測該標記；及

e)一資訊處理部件，用於取決於是否偵測到該標記來判定該樣本中是否存在具有互補於該探針且衍生自甲狀腺癌的一序列之cfDNA。

【請求項89】　如請求項88之用於診斷甲狀腺癌的裝置，其中甲狀腺癌中特異地表現之該基因更包含一結合有生物素的探針，該探針係互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*TG*、*CALCA*、*APOC1*、*HIG2*、及其之組合。

【請求項90】　如請求項89之用於診斷甲狀腺癌的裝置，其中該裝置更包含一結合有生物素的探針，該探針係互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*ENO2*、*ACPP*、*TYRO3*、*CPT1A*、*IFNG*、*CD279*、*CD274*、*ERBB2*、

EGFR、*FOLR1*、*EPCAM*、及其之組合。

【請求項91】　一種用於診斷膀胱癌的方法，其藉由在不擴增之下偵測衍生自來自一樣本的膀胱癌細胞之一基因，其中該方法包含

a)將單離自一個體之包含游離DNA (下稱cfDNA)的一生物樣本與一帶正電材料混合的一步驟；

b)單離結合有cfDNA之該帶正電材料的一步驟；

c)在混合物中依序地或同時地混合具有互補於該cfDNA的一序列之一探針與一標記的一步驟；

d)移除未結合至cfDNA之該探針與該標記的一步驟；及

e)偵測該標記的一步驟，

其中該cfDNA係衍生自膀胱癌細胞，及

具有互補於cfDNA的一序列之該探針係互補地結合至已知為一膀胱癌生物標記之一基因。

【請求項92】　如請求項91之用於診斷膀胱癌的方法，其特徵在於，由膀胱癌細胞所衍生之該cfDNA

i)具有比起具有衍生自正常細胞的一雙螺旋結構之cfDNA所具者較低之一Tm值，或

ii)在具有衍生自正常細胞的一雙螺旋結構之該cfDNA不變性之一條件下變性。

【請求項93】　如請求項91之用於診斷膀胱癌的方法，其中衍生自膀胱癌細胞之該cfDNA能夠在下列條件中之任一者與互補地結合至cfDNA之15聚體至30聚體探針結合：

i)在周遭溫度下靜置1分鐘至120分鐘的條件；

ii)在90 °C至95 °C下加熱1秒至3分鐘的條件；

iii)在75 °C至90 °C下加熱1秒至5分鐘的條件；

iv)在60 °C至75 °C下加熱30秒至30分鐘的條件；

v)在25 °C至40 °C下加熱10分鐘至120分鐘的條件；

vi)以蛋白酶處理1分鐘至10分鐘的條件；

vii)以DNase處理1分鐘至10分鐘的條件；及

viii)以化學物質(例如氫氧化鈉、DMSO、表面活性劑等)處理的條件。

【請求項94】　如請求項91之用於診斷膀胱癌的方法，其中衍生自膀胱癌細胞之該cfDNA是衍生自膀胱癌之循環腫瘤DNA。

【請求項95】　如請求項94之用於診斷膀胱癌的方法，其中具有互補於cfDNA的一序列之該探針係互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*OGT*、*FGFR3*、*TP53*、*NUMA1*、*COCH*、*CELSR3*、*HMOX1*、*KIF1A*、*MGC17624*、*MTAP*、*PFKFB4*、*S100A8*、*RSPH9*、*FOXM1*、*FANCB*、*FANCC*、*FANCD2*、*RUSC1-AS1*、*CACNA1B*、*IMP-1*、*PDE3A*、*POU3F4*、*SOX3*、*DMC1*、*PLXDC2*、*ZNF312*、*SYCP2L*、*HOXA9*、*ISL1*、*ALDH1A3*、及其之組合。

【請求項96】　如請求項91之用於診斷膀胱癌的方法，其特徵在於，該方法更包含在上述步驟c)前，在下列條件中之任一者使結合至該帶正電材料之該樣本或cfDNA變性的一步驟：

i)在周遭溫度下靜置1分鐘至10分鐘的條件；

ii)在90 °C至95 °C下加熱1秒至1分鐘的條件；

iii)在75 °C至90 °C下加熱10秒至3分鐘的條件；

v)在60 °C至75 °C下加熱1分鐘至30分鐘的條件；

v)在25 °C至40 °C下加熱5分鐘至60分鐘的條件；

vi)以蛋白酶處理1分鐘至10分鐘的條件；

vii)以DNase處理1分鐘至10分鐘的條件；及

viii)以化學物質(例如氫氧化鈉、DMSO、表面活性劑等)處理的條件。

【請求項97】　如請求項91之用於診斷膀胱癌的方法，其中該樣本是選自由下列組成之群組中之任一者：尿液、腦脊髓液、血漿、血液、肋膜積液、腹水、唾液、痰、及體液。

【請求項98】　如請求項91之用於診斷膀胱癌的方法，其中該帶正電材料是一帶正電奈米線。

【請求項99】　如請求項98之用於診斷膀胱癌的方法，其中該奈米線包含一導電聚合物。

【請求項100】 如請求項99之用於診斷膀胱癌的方法，其中該奈米線更包含生物素。

【請求項101】 如請求項99之用於診斷膀胱癌的方法，其中該導電聚合物選自由下列組成之群組中之任一者：聚(乙炔)、聚(吡咯)、聚(噻吩)、聚(對苯)、聚(3,4-乙烯二氧基噻吩)、聚(苯硫醚)、聚(對苯伸乙烯)、及聚苯胺。

【請求項102】 如請求項91之用於診斷膀胱癌的方法，其中該探針是由15聚體至30聚體之核苷酸構成。

【請求項103】 如請求項91之用於診斷膀胱癌的方法，其中至少一個生物素係結合至該探針。

【請求項104】 如請求項91之用於診斷膀胱癌的方法，其中該標記是選自由下列組成之群組中之任一者：量子點、HRP (辣根過氧化酶)、螢光蛋白、磷光體、鹼性磷酸酶、及螢光素酶。

【請求項105】 如請求項104之用於診斷膀胱癌的方法，其中一基於抗生物素蛋白之蛋白質係結合至該標記。

【請求項106】 如請求項104之用於診斷膀胱癌的方法，其中該基於抗生物素蛋白之蛋白質是選自由下列組成之群組中之任一者：抗生物素蛋白、鏈黴抗生

物素蛋白、及其之組合。

【請求項107】 如請求項91之用於診斷膀胱癌的方法，其中該標記是包含一導電聚合物；玻尿酸；抗生物素蛋白或鏈黴抗生物素蛋白；及一HRP(辣根過氧化酶)或一螢光蛋白的一奈米顆粒。

【請求項108】 如請求項91之用於診斷膀胱癌的方法，其中該cfDNA更包含由選自由下列組成之群組中之至少任一基因所衍生之一者：*KRT19*、*CCNB1*、*CPT1A*、*IFNG*、*CD279*、*CD274*、*ERBB2*、*EGFR*、*FOLR1*、*EPCAM*、及其之組合。

【請求項109】 如請求項91之用於診斷膀胱癌的方法，其中該標記是在步驟e)中藉由顏色變化、UV吸光度變化、螢光變化、或電化學變化來偵測。

【請求項110】 一種用於診斷膀胱癌的診斷套組，包含

一結合有生物素的探針，該探針互補地結合至膀胱癌中特異地表現之一基因；

一帶正電材料；

結合有一基於抗生物素蛋白之蛋白質的一標記；及

一手冊，

其中該手冊說明了該套組係構設成能夠在無基因擴增之下藉由下列流程來診斷膀胱癌：

a)使用該套組內含的一帶正電材料來單離cfDNA，該cfDNA係來自單離自一個體之一生物樣本；b)在該單離之cfDNA中依序地或同時地混合該套組內含的一結合有生物素的探針與該套組內含的一標記；c)移除未結合至cfDNA之該探針與該標記；及d)偵測該標記的信號。

【請求項111】 如請求項110之診斷套組，其中膀胱癌中特異地表現之該基因是選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*OGT*、*FGFR3*、*TP53*、*NUMA1*、

COCH、*CELSR3*、*HMOX1*、*KIF1A*、*MGC17624,*、*MTAP*、*PFKFB4*、*S100A8*、*RSPH9*、*FOXM1*、*FANCB*、*FANCC*、*FANCD2*、*RUSC1-AS1*、*CACNA1B*、*IMP-1*、*PDE3A*、*POU3F4*、*SOX3*、*DMC1*、*PLXDC2*、*ZNF312*、*SYCP2L*、*HOXA9*、*ISL1*、*ALDH1A3*、及其之組合。

【請求項112】 如請求項110之診斷套組，其中該套組更包含一結合有生物素的探針，該探針互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*KRT19*、*CCNB1*、*CPT1A*、*IFNG*、*CD279*、*CD274*、*ERBB2*、*EGFR*、*FOLR1*、*EPCAM*、及其之組合。

【請求項113】 如請求項110之診斷套組，其中該帶正電材料是一帶正電奈米線。

【請求項114】 如請求項113之診斷套組，其中該奈米線包含一導電聚合物。

【請求項115】 如請求項114之診斷套組，其中該奈米線更包含生物素。

【請求項116】 如請求項113之診斷套組，其中該導電聚合物選自由下列組成之群組中之任一者：聚(乙炔)、聚(吡咯)、聚(噻吩)、聚(對苯)、聚(3,4-乙烯二氧基噻吩)、聚(苯硫醚)、聚(對苯伸乙烯)、及聚苯胺。

【請求項117】 如請求項110之診斷套組，其中該標記是包含一導電聚合物；玻尿酸；抗生物素蛋白或鏈黴抗生物素蛋白；及一HRP (辣根過氧化酶)或一螢光蛋白的一奈米顆粒。

【請求項118】 一種用於診斷膀胱癌的裝置，其藉由在不擴增之下偵測衍生自來自一樣本的膀胱癌細胞之一基因，其中該裝置包含

a)一混合部件，用於將單離自一個體之包含cfDNA的一生物樣本與一帶正電材料混合；

b)一獲取部件，用於移除除結合有cfDNA之該帶正電材料外之該樣本；

c)一反應部件，用於依序地或同時地將一結合有生物素之能夠互補地結合至膀胱癌中特異地表現之基因的探針；及包含鏈黴抗生物素蛋白與一標記的一奈米顆粒添加至結合有cfDNA之該帶正電材料；

d)一偵測部件，用於偵測該標記；及

e)一資訊處理部件，用於取決於是否偵測到該標記來判定該樣本中是否存在具有互補於該探針且衍生自膀胱癌的一序列之cfDNA。

【請求項119】 如請求項118之用於診斷膀胱癌的裝置，其中膀胱癌中特異地表現之該基因更包含一結合有生物素的探針，該探針係互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*OGT*、*FGFR3*、*TP53*、*NUMA1*、*COCH*、*CELSR3*、*HMOX1*、*KIF1A*、*MGC17624*、*MTAP*、*PFKFB4*、*S100A8*、*RSPH9*、*FOXM1*、*FANCB*、*FANCC*、*FANCD2*、*RUSC1-AS1*、*CACNA1B*、*IMP-1*、*PDE3A*、*POU3F4*、*SOX3,*、*DMC1*、*PLXDC2*、*ZNF312*、*SYCP2L*、*HOXA9*、*ISL1*、*ALDH1A3*、及其之組合。

【請求項120】 如請求項119之用於診斷膀胱癌的裝置，其中該裝置更包含一結合有生物素的探針，該探針係互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*KRT19*、*CCNB1*、*CPT1A*、*IFNG*、*CD279*、*CD274*、*ERBB2*、*EGFR*、*FOLR1*、*EPCAM*、及其之組合。

【請求項121】 一種用於診斷乳癌的方法，其藉由在不擴增之下偵測衍生自來自一樣本的乳癌細胞之一基因，其中該方法包含

a)將單離自一個體之包含游離DNA (下稱cfDNA)的一生物樣本與一帶正電材料混合的一步驟；

b)單離結合有cfDNA之該帶正電材料的一步驟；

c)在混合物中依序地或同時地混合具有互補於該cfDNA的一序列之一探針與一標記的一步驟；

d)移除未結合至cfDNA之該探針與該標記的一步驟；及

e)偵測該標記的一步驟，

其中該cfDNA係衍生自乳癌細胞，及

具有互補於cfDNA的一序列之該探針係互補地結合至已知為一乳癌生物標記之一基因。

【請求項122】 如請求項121之用於診斷乳癌的方法，其特徵在於，衍生自乳癌細胞之該cfDNA

i)具有比起具有衍生自正常細胞的一雙螺旋結構之cfDNA所具者較低之一Tm值，或

ii)在具有衍生自正常細胞的一雙螺旋結構之該cfDNA不變性之一條件下變性。

【請求項123】 如請求項121之用於診斷乳癌的方法，其中衍生自乳癌細胞之該cfDNA能夠在下列條件中之任一者與互補地結合至cfDNA之15聚體至30聚體探針結合：

i)在周遭溫度下靜置1分鐘至120分鐘的條件；

ii)在90 °C至95 °C下加熱1秒至3分鐘的條件；

iii)在75 °C至90 °C下加熱1秒至5分鐘的條件；

iv)在60 °C至75 °C下加熱30秒至30分鐘的條件；

v)在25 °C至40 °C下加熱10分鐘至120分鐘的條件；

vi)以蛋白酶處理1分鐘至10分鐘的條件；

vii)以DNase處理1分鐘至10分鐘的條件；及

viii)以化學物質(例如氫氧化鈉、DMSO、表面活性劑等)處理的條件。

【請求項124】 如請求項121之用於診斷乳癌的方法，其中衍生自乳癌細胞之該cfDNA是衍生自乳癌之循環腫瘤DNA。

【請求項125】 如請求項124之用於診斷乳癌的方法，其中具有互補於cfDNA的一序列之該探針係互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*MEST*、*NR1D1*、*BIRC5*、*RACGAP1*、*DHCR7*、*STC2*、*AZGP1*、*RBBP8*、*IL6ST*、*MGP*、*TRBC1*、*MMP11*、*COL10A1*、*C10orf64*、*COL11A1*、*POTEG*、*FSIP1*、*HER2*、及其之組合。

【請求項126】 如請求項121之用於診斷乳癌的方法，其特徵在於，該方法更包含在上述步驟c)前，在下列條件中之任一者使結合至該帶正電材料之該樣本或cfDNA變性的一步驟：

i)在周遭溫度下靜置1分鐘至10分鐘的條件；

ii)在90 °C至95 °C下加熱1秒至1分鐘的條件；

iii)在75 °C至90 °C下加熱10秒至3分鐘的條件；

v)在60 °C至75 °C下加熱1分鐘至30分鐘的條件；

v)在25 °C至40 °C下加熱5分鐘至60分鐘的條件；

vi)以蛋白酶處理1分鐘至10分鐘的條件；

vii)以DNase處理1分鐘至10分鐘的條件；及

viii)以化學物質(例如氫氧化鈉、DMSO、表面活性劑等)處理的條件。

【請求項127】 如請求項121之用於診斷乳癌的方法，其中該樣本是選自由下列組成之群組中之任一者：尿液、腦脊髓液、血漿、血液、肋膜積液、腹水、唾液、痰、及體液。

【請求項128】 如請求項1之用於診斷乳癌的方法，其中該帶正電材料是一帶正電奈米線。

【請求項129】 如請求項128之用於診斷乳癌的方法，其中該奈米線包含一導電聚合物。

【請求項130】 如請求項129之用於診斷乳癌的方法，其中該奈米線更包含

生物素。

【請求項131】 如請求項129之用於診斷乳癌的方法，其中該導電聚合物選自由下列組成之群組中之任一者：聚(乙炔)、聚(吡咯)、聚(噻吩)、聚(對苯)、聚(3,4-乙烯二氧基噻吩)、聚(苯硫醚)、聚(對苯伸乙烯)、及聚苯胺。

【請求項132】 如請求項121之用於診斷乳癌的方法，其中該探針是由15聚體至30聚體之核苷酸構成。

【請求項133】 如請求項121之用於診斷乳癌的方法，其中至少一個生物素係結合至該探針。

【請求項134】 如請求項121之用於診斷乳癌的方法，其中該標記是選自由下列組成之群組中之任一者：量子點、HRP (辣根過氧化酶)、螢光蛋白、磷光體、鹼性磷酸酶、及螢光素酶。

【請求項135】 如請求項134之用於診斷乳癌的方法，其中一基於抗生物素蛋白之蛋白質係結合至該標記。

【請求項136】 如請求項134之用於診斷乳癌的方法，其中該基於抗生物素蛋白之蛋白質是選自由下列組成之群組中之任一者：抗生物素蛋白、鏈黴抗生物素蛋白、及其之組合。

【請求項137】 如請求項121之用於診斷乳癌的方法，其中該標記是包含一導電聚合物；玻尿酸；抗生物素蛋白或鏈黴抗生物素蛋白；及一HRP (辣根過氧化酶)或一螢光蛋白的一奈米顆粒。

【請求項138】 如請求項121之用於診斷乳癌的方法，其中該cfDNA更包含由選自由下列組成之群組中之至少任一基因所衍生之一者：*MUC1*、*ACPP*、*TYRO3*、*UBE2C*、*CPT1A*、*IFNG*、*CD279*、*CD274*、*ERBB2*、*EGFR*、*FOLR1*、*EPCAM*、及其之組合。

【請求項139】 如請求項121之用於診斷乳癌的方法，其中該標記是在步驟

e)中藉由顏色變化、UV吸光度變化、螢光變化、或電化學變化來偵測。

【請求項140】 一種用於診斷乳癌的診斷套組，包含

一結合有生物素的探針，該探針互補地結合至乳癌中特異地表現之一基因；

一帶正電材料；

結合有一基於抗生物素蛋白之蛋白質的一標記；及

一手冊，

其中該手冊說明了該套組係構設成能夠在無基因擴增之下藉由下列流程來診斷乳癌：

a)使用該套組內含的一帶正電材料來單離cfDNA，該cfDNA係來自單離自一個體之一生物樣本；b)在該單離之cfDNA中依序地或同時地混合該套組內含的一結合有生物素的探針與該套組內含的一標記；c)移除未結合至cfDNA之該探針與該標記；及d)偵測該標記的信號。

【請求項141】 如請求項140之診斷套組，其中乳癌中特異地表現之該基因更包含一結合有生物素的探針，該探針係互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*MEST*、*NR1D1*、*BIRC5*、*RACGAP1*、*DHCR7*、*STC2*、*AZGP1*、*RBBP8*、*IL6ST*、*MGP*、*TRBC1*、*MMP11*、*COL10A1*、*C10orf64*、*COL11A1*、*POTEG*、*FSIP1*、*HER2*、及其之組合。

【請求項142】 如請求項140之診斷套組，其中該套組更包含一結合有生物素的探針，該探針互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*MUC1*、*ACPP*、*TYRO3*、*UBE2C*、*CPT1A*、*IFNG*、*CD279*、*CD274*、*ERBB2*、*EGFR*、*FOLR1*、*EPCAM*、及其之組合。

【請求項143】 如請求項140之診斷套組，其中該帶正電材料是一帶正電奈米線。

【請求項144】 如請求項143之診斷套組，其中該奈米線包含一導電聚合

物。

【請求項145】 如請求項144之診斷套組，其中該奈米線更包含生物素。

【請求項146】 如請求項143之診斷套組，其中該導電聚合物選自由下列組成之群組中之任一者：聚(乙炔)、聚(吡咯)、聚(噻吩)、聚(對苯)、聚(3,4-乙烯二氧基噻吩)、聚(苯硫醚)、聚(對苯伸乙烯)、及聚苯胺。

【請求項147】 如請求項140之診斷套組，其中該標記是包含一導電聚合物；玻尿酸；抗生物素蛋白或鏈黴抗生物素蛋白；及一HRP (辣根過氧化酶)或一螢光蛋白的一奈米顆粒。

【請求項148】 一種用於診斷乳癌的裝置，其藉由在不擴增之下偵測衍生自來自一樣本的乳癌細胞之一基因，其中該裝置包含

a)一混合部件，用於將單離自一個體之包含cfDNA的一生物樣本與一帶正電材料混合；

b)一獲取部件，用於移除除結合有cfDNA之該帶正電材料外之該樣本；

c)一反應部件，用於依序地或同時地將一結合有生物素之能夠互補地結合至乳癌中特異地表現之基因的探針；及包含鏈黴抗生物素蛋白與一標記的一奈米顆粒添加至結合有cfDNA之該帶正電材料；

d)一偵測部件，用於偵測該標記；及

e)一資訊處理部件，用於取決於是否偵測到該標記來判定該樣本中是否存在具有互補於該探針且衍生自乳癌的一序列之cfDNA。

【請求項149】 如請求項148之用於診斷乳癌的裝置，其中乳癌中特異地表現之該基因更包含一結合有生物素的探針，該探針係互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*MEST*、*NR1D1*、*BIRC5*、*RACGAP1*、*DHCR7*、*STC2*、*AZGP1*、*RBBP8*、*IL6ST*、*MGP*、*TRBC1*、*MMP11*、*COL10A1*、*C10orf64*、*COL11A1*、*POTEG*、*FSIP1*、*HER2*、及其之組合。

【請求項150】 如請求項149之用於診斷乳癌的裝置，其中該裝置更包含一結合有生物素的探針，該探針係互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*MUC1*、*ACPP*、*TYRO3*、*UBE2C*、*CPT1A*、*IFNG*、*CD279*、*CD274*、*ERBB2*、*EGFR*、*FOLR1*、*EPCAM*、及其之組合。

【請求項151】 一種用於診斷大腸直腸癌的方法，其藉由在不擴增之下偵測衍生自來自一樣本的大腸直腸癌細胞之一基因，其中該方法包含

a)將單離自一個體之包含游離DNA (下稱cfDNA)的一生物樣本與一帶正電材料混合的一步驟；

b)單離結合有cfDNA之該帶正電材料的一步驟；

c)在混合物中依序地或同時地混合具有互補於該cfDNA的一序列之一探針與一標記的一步驟；

d)移除未結合至cfDNA之該探針與該標記的一步驟；及

e)偵測該標記的一步驟，

其中該cfDNA係衍生自大腸直腸癌細胞，及

具有互補於cfDNA的一序列之該探針係互補地結合至已知為一大腸直腸癌生物標記之一基因。

【請求項152】 如請求項151之用於診斷大腸直腸癌的方法，其特徵在於，衍生自大腸直腸癌細胞之該cfDNA

i)具有比起具有衍生自正常細胞的一雙螺旋結構之cfDNA所具者較低之一Tm值，或

ii)在具有衍生自正常細胞的一雙螺旋結構之該cfDNA不變性之一條件下變性。

【請求項153】 如請求項151之用於診斷大腸直腸癌的方法，其中衍生自大腸直腸癌細胞之該cfDNA能夠在下列條件中之任一者與互補地結合至cfDNA之

15聚體至30聚體探針結合：

i)在周遭溫度下靜置1分鐘至120分鐘的條件；

ii)在90 °C至95 °C下加熱1秒至3分鐘的條件；

iii)在75 °C至90 °C下加熱1秒至5分鐘的條件；

iv)在60 °C至75 °C下加熱30秒至30分鐘的條件；

v)在25 °C至40 °C下加熱10分鐘至120分鐘的條件；

vi)以蛋白酶處理1分鐘至10分鐘的條件；

vii)以DNase處理1分鐘至10分鐘的條件；及

viii)以化學物質(例如氫氧化鈉、DMSO、表面活性劑等)處理的條件。

【請求項154】 如請求項151之用於診斷大腸直腸癌的方法，其中衍生自大腸直腸癌細胞之該cfDNA是衍生自大腸直腸癌之循環腫瘤DNA。

【請求項155】 如請求項154之用於診斷大腸直腸癌的方法，其中具有互補於cfDNA的一序列之該探針係互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*NCKAP1*、*AUNIP*、*NOTUM*、*KRT5*、*TUBB*、*COL6A1*、*JUP*、*CDX2*、*MELTF*、*EFEMP2*、*DEFA5*、*CHEK1*、*MAD2L1*、*ENC1*、*CSE1L*、*RAD51AP1*、*ERICH3*、*SLC7A11*、*KRT23*、*PLAU*、*CDCA1*、*KLK6*、*DPEP1*、*CDH3*、*ANLN*、*CXCL1*、*CTHRC1*、*LCN2*、*HS6ST2*、*EGFL6*、*CXCL3*、*CA9*、*PROX1*、*SPP1*、*CST1*、*CXCL2*、*TSTA3*、*RRM2*、*MMP3*、*MMP7*、*MMP10*、*CXCL5*、*SERPINB5*、*TEAD4*、*BUB1*、*CDC2*、*CLDN2*、*HSPH1*、*LY6G6D*、*PRC1*、*PUS1*、*SQLE*、*TTK*、*ECT2*、*RNF183*、*FBXO39*、*TEX38*、*TTLL2*、*PRR7*、*CANP*、*KIAA0101*、及其之組合。

【請求項156】 如請求項151之用於診斷大腸直腸癌的方法，其特徵在於，該方法更包含在上述步驟c)前，在下列條件中之任一者使結合至該帶正電材料之該樣本或cfDNA變性的一步驟：

i)在周遭溫度下靜置1分鐘至10分鐘的條件；

ii)在90 °C至95 °C下加熱1秒至1分鐘的條件；

iii)在75 °C至90 °C下加熱10秒至3分鐘的條件；

v)在60 °C至75 °C下加熱1分鐘至30分鐘的條件；

v)在25 °C至40 °C下加熱5分鐘至60分鐘的條件；

vi)以蛋白酶處理1分鐘至10分鐘的條件；

vii)以DNase處理1分鐘至10分鐘的條件；及

viii)以化學物質(例如氫氧化鈉、DMSO、表面活性劑等)處理的條件。

【請求項157】 如請求項151之用於診斷大腸直腸癌的方法，其中該樣本是選自由下列組成之群組中之任一者：尿液、腦脊髓液、血漿、血液、肋膜積液、腹水、唾液、痰、及體液。

【請求項158】 如請求項151之用於診斷大腸直腸癌的方法，其中該帶正電材料是一帶正電奈米線。

【請求項159】 如請求項158之用於診斷大腸直腸癌的方法，其中該奈米線包含一導電聚合物。

【請求項160】 如請求項159之用於診斷大腸直腸癌的方法，其中該奈米線更包含生物素。

【請求項161】 如請求項159之用於診斷大腸直腸癌的方法，其中該導電聚合物選自由下列組成之群組中之任一者：聚(乙炔)、聚(吡咯)、聚(噻吩)、聚(對苯)、聚(3,4-乙烯二氧基噻吩)、聚(苯硫醚)、聚(對苯伸乙烯)、及聚苯胺。

【請求項162】 如請求項151之用於診斷大腸直腸癌的方法，其中該探針是由15聚體至30聚體之核苷酸構成。

【請求項163】 如請求項151之用於診斷大腸直腸癌的方法，其中至少一個生物素係結合至該探針。

【請求項164】 如請求項151之用於診斷大腸直腸癌的方法，其中該標記是選自由下列組成之群組中之任一者：量子點、HRP(辣根過氧化酶)、螢光蛋白、磷光體、鹼性磷酸酶、及螢光素酶。

【請求項165】 如請求項164之用於診斷大腸直腸癌的方法，其中一基於抗生物素蛋白之蛋白質係結合至該標記。

【請求項166】 如請求項164之用於診斷大腸直腸癌的方法，其中該基於抗生物素蛋白之蛋白質是選自由下列組成之群組中之任一者：抗生物素蛋白、鏈黴抗生物素蛋白、及其之組合。

【請求項167】 如請求項151之用於診斷大腸直腸癌的方法，其中該標記是包含一導電聚合物；玻尿酸；抗生物素蛋白或鏈黴抗生物素蛋白；及一HRP(辣根過氧化酶)或一螢光蛋白的一奈米顆粒。

【請求項168】 如請求項151之用於診斷大腸直腸癌的方法，其中該cfDNA更包含由選自由下列組成之群組中之至少任一基因所衍生之一者：*ACPP*、*FLU3*、*TYRO3*、*COTL1*、*CK7*、*CK20*、*MUC2*、*SDC2*、*ASB9*、*CCNB1*、*MELK*、*CKS2*、*IFITM1*、*CEACAM6*、*ATAD2*、*TOP2A*、*CPT1A*、*DSCC1*、*IFNG*、*CD279*、*CD274*、*ERBB2*、*EGFR*、*FOLR1*、*EPCA*、及其之組合。

【請求項169】 如請求項151之用於診斷大腸直腸癌的方法，其中該標記是在步驟e)中藉由顏色變化、UV吸光度變化、螢光變化、或電化學變化來偵測。

【請求項170】 一種用於診斷大腸直腸癌的診斷套組，包含

一結合有生物素的探針，該探針互補地結合至大腸直腸癌中特異地表現之一基因；

一帶正電材料；

結合有一基於抗生物素蛋白之蛋白質的一標記；及

一手冊，

其中該手冊說明了該套組係構設成能夠在無基因擴增之下藉由下列流程來診斷大腸直腸癌：

a)使用該套組內含的一帶正電材料來單離cfDNA，該cfDNA係來自單離自一個體之一生物樣本；b)在該單離之cfDNA中依序地或同時地混合該套組內含的一結合有生物素的探針與該套組內含的一標記；c)移除未結合至cfDNA之該探針與該標記；及d)偵測該標記的信號。

【請求項171】 如請求項170之診斷套組，其中大腸直腸癌中特異地表現之該基因是選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*NCKAP1*、*AUNIP*、*NOTUM*、*KRT5*、*TUBB*、*COL6A1*、*JUP*、*CDX2*、*MELTF*、*EFEMP2*、*DEFA5*、*CHEK1*、*MAD2L1*、*ENC1*、*CSE1L*、*RAD51AP1*、*ERICH3*、*SLC7A11*、*KRT23*、*PLAU*、*CDCA1*、*KLK6*、*DPEP1*、*CDH3*、*ANLN*、*CXCL1*、*CTHRC1*、*LCN2*、*HS6ST2*、*EGFL6*、*CXCL3*、*CA9*、*PROX1*、*SPP1*、*CST1*、*CXCL2*、*TSTA3*、*RRM2*、*MMP3*、*MMP7*、*MMP10*、*CXCL5*、*SERPINB5*、*TEAD4*、*BUB1*、*CDC2*、*CLDN2*、*HSPH1*、*LY6G6D*、*PRC1*、*PUS1*、*SQLE*、*TTK*、*ECT2*、*RNF183*、*FBXO39*、*TEX38*、*TTLL2*、*PRR7*、*CANP*、*KIAA0101*、及其之組合。

【請求項172】 如請求項170之診斷套組，其中該套組更包含一結合有生物素的探針，該探針互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*ACPP*、*FLU3*、*TYRO3*、*COTL1*、*CK7*、*CK20*、*MUC2*、*SDC2*、*ASB9*、*CCNB1*、*MELK*、*CKS2*、*IFITM1*、*CEACAM6*、*ATAD2*、*TOP2A*、*CPT1A*、*DSCC1*、*IFNG*、*CD279*、*CD274*、*ERBB2*、*EGFR*、*FOLR1*、*EPCAM*、及其之組合。

【請求項173】 如請求項170之診斷套組，其中該帶正電材料是一帶正電奈米線。

【請求項174】 如請求項173之診斷套組，其中該奈米線包含一導電聚合物。

【請求項175】 如請求項174之診斷套組，其中該奈米線更包含生物素。

【請求項176】 如請求項173之診斷套組，其中該導電聚合物選自由下列組成之群組中之任一者：聚(乙炔)、聚(吡咯)、聚(噻吩)、聚(對苯)、聚(3,4-乙烯二氧基噻吩)、聚(苯硫醚)、聚(對苯伸乙烯)、及聚苯胺。

【請求項177】 如請求項170之診斷套組，其中該標記是包含一導電聚合物；玻尿酸；抗生物素蛋白或鏈黴抗生物素蛋白；及一HRP (辣根過氧化酶)或一螢光蛋白的一奈米顆粒。

【請求項178】 一種用於診斷大腸直腸癌的裝置，其藉由在不擴增之下偵測衍生自來自一樣本的大腸直腸癌細胞之一基因，其中該裝置包含

a)一混合部件，用於將單離自一個體之包含cfDNA的一生物樣本與一帶正電材料混合；

b)一獲取部件，用於移除除結合有cfDNA之該帶正電材料外之該樣本；

c)一反應部件，用於依序地或同時地將一結合有生物素之能夠互補地結合至大腸直腸癌中特異地表現之基因的探針；及包含鏈黴抗生物素蛋白與一標記的一奈米顆粒添加至結合有cfDNA之該帶正電材料；

d)一偵測部件，用於偵測該標記；及

e)一資訊處理部件，用於取決於是否偵測到該標記來判定該樣本中是否存在具有互補於該探針且衍生自大腸直腸癌的一序列之cfDNA。

【請求項179】 如請求項178之用於診斷大腸直腸癌的裝置，其中大腸直腸癌中特異地表現之該基因更包含一結合有生物素的探針，該探針係互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*NCKAP1*、*AUNIP*、*NOTUM*、*KRT5*、*TUBB*、*COL6A1*、*JUP*、*CDX2*、*MELTF*、*EFEMP2*、*DEFA5*、*CHEK1*、*MAD2L1*、*ENC1*、*CSE1L*、*RAD51AP1*、*ERICH3*、*SLC7A11*、*KRT23*、*PLAU*、*CDCA1*、*KLK6*、*DPEP1*、*CDH3*、*ANLN*、*CXCL1*、*CTHRC1*、*LCN2*、*HS6ST2*、*EGFL6*、*CXCL3*、

CA9、*PROX1*、*SPP1*、*CST1*、*CXCL2*、*TSTA3*、*RRM2*、*MMP3*、*MMP7*、*MMP10*、*CXCL5*、*SERPINB5*、*TEAD4*、*BUB1*、*CDC2*、*CLDN2*、*HSPH1*、*LY6G6D*、*PRC1*、*PUS1*、*SQLE*、*TTK*、*ECT2*、*RNF183*、*FBXO39*、*TEX38*、*TTLL2*、*PRR7*、*CANP*、*KIAA0101*、及其之組合。

【請求項180】 如請求項179之用於診斷大腸直腸癌的裝置，其中該裝置更包含一結合有生物素的探針，該探針係互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*ACPP*、*FLU3*、*TYRO3*、*COTL1*、*CK7*、*CK20*、*MUC2*、*SDC2*、*ASB9*、*CCNB1*、*MELK*、*CKS2*、*IFITM1*、*CEACAM6*、*ATAD2*、*TOP2A*、*CPT1A*、*DSCC1*、*IFNG*、*CD279*、*CD274*、*ERBB2*、*EGFR*、*FOLR1*、*EPCAM*、及其之組合。

【請求項181】 一種用於診斷膽管癌的方法，其藉由在不擴增之下偵測衍生自來自一樣本的膽管癌細胞之一基因，其中該方法包含

a)將單離自一個體之包含游離DNA (下稱cfDNA)的一生物樣本與一帶正電材料混合的一步驟；

b)單離結合有cfDNA之該帶正電材料的一步驟；

c)在混合物中依序地或同時地混合具有互補於該cfDNA的一序列之一探針與一標記的一步驟；

d)移除未結合至cfDNA之該探針與該標記的一步驟；及

e)偵測該標記的一步驟，

其中該cfDNA係衍生自膽管癌細胞，及

具有互補於cfDNA的一序列之該探針係互補地結合至已知為一膽管癌生物標記之一基因。

【請求項182】 如請求項181之用於診斷膽管癌的方法，其特徵在於，衍生自膽管癌細胞之該cfDNA

i)具有比起具有衍生自正常細胞的一雙螺旋結構之cfDNA所具者較低之一Tm值，或

ii)在具有衍生自正常細胞的一雙螺旋結構之該cfDNA不變性之一條件下變性。

【請求項183】 如請求項181之用於診斷膽管癌的方法，其中衍生自膽管癌細胞之該cfDNA能夠在下列條件中之任一者與互補地結合至cfDNA之15聚體至30聚體探針結合：

i)在周遭溫度下靜置1分鐘至120分鐘的條件；

ii)在90 °C至95 °C下加熱1秒至3分鐘的條件；

iii)在75 °C至90 °C下加熱1秒至5分鐘的條件；

iv)在60 °C至75 °C下加熱30秒至30分鐘的條件；

v)在25 °C至40 °C下加熱10分鐘至120分鐘的條件；

vi)以蛋白酶處理1分鐘至10分鐘的條件；

vii)以DNase處理1分鐘至10分鐘的條件；及

viii)以化學物質(例如氫氧化鈉、DMSO、表面活性劑等)處理的條件。

【請求項184】 如請求項181之用於診斷膽管癌的方法，其中衍生自膽管癌細胞之該cfDNA是衍生自膽管癌之循環腫瘤DNA。

【請求項185】 如請求項184之用於診斷膽管癌的方法，其中具有互補於cfDNA的一序列之該探針係互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*MUC16*、*ASH1L*、*DOCK7*、及其之組合。

【請求項186】 如請求項181之用於診斷膽管癌的方法，其特徵在於，該方法更包含在上述步驟c)前，在下列條件中之任一者使結合至該帶正電材料之該樣本或cfDNA變性的一步驟：

i)在周遭溫度下靜置1分鐘至10分鐘的條件；

ii)在90 °C至95 °C下加熱1秒至1分鐘的條件；

iii)在75 °C至90 °C下加熱10秒至3分鐘的條件；

v)在60 °C至75 °C下加熱1分鐘至30分鐘的條件；

v)在25 °C至40 °C下加熱5分鐘至60分鐘的條件；

vi)以蛋白酶處理1分鐘至10分鐘的條件；

vii)以DNase處理1分鐘至10分鐘的條件；及

viii)以化學物質(例如氫氧化鈉、DMSO、表面活性劑等)處理的條件。

【請求項187】 如請求項181之用於診斷膽管癌的方法，其中該樣本是選自由下列組成之群組中之任一者：尿液、腦脊髓液、血漿、血液、肋膜積液、腹水、唾液、痰、及體液。

【請求項188】 如請求項181之用於診斷膽管癌的方法，其中該帶正電材料是一帶正電奈米線。

【請求項189】 如請求項188之用於診斷膽管癌的方法，其中該奈米線包含一導電聚合物。

【請求項190】 如請求項189之用於診斷膽管癌的方法，其中該奈米線更包含生物素。

【請求項191】 如請求項189之用於診斷膽管癌的方法，其中該導電聚合物選自由下列組成之群組中之任一者：聚(乙炔)、聚(吡咯)、聚(噻吩)、聚(對苯)、聚(3,4-乙烯二氧基噻吩)、聚(苯硫醚)、聚(對苯伸乙烯)、及聚苯胺。

【請求項192】 如請求項181之用於診斷膽管癌的方法，其中該探針是由15聚體至30聚體之核苷酸構成。

【請求項193】 如請求項181之用於診斷膽管癌的方法，其中至少一個生物素係結合至該探針。

【請求項194】 如請求項181之用於診斷膽管癌的方法，其中該標記是選自

由下列組成之群組中之任一者：量子點、HRP (辣根過氧化酶)、螢光蛋白、磷光體、鹼性磷酸酶、及螢光素酶。

【請求項195】 如請求項194之用於診斷膽管癌的方法，其中一基於抗生物素蛋白之蛋白質係結合至該標記。

【請求項196】 如請求項194之用於診斷膽管癌的方法，其中該基於抗生物素蛋白之蛋白質是選自由下列組成之群組中之任一者：抗生物素蛋白、鏈黴抗生物素蛋白、及其之組合。

【請求項197】 如請求項181之用於診斷膽管癌的方法，其中該標記是包含一導電聚合物；玻尿酸；抗生物素蛋白或鏈黴抗生物素蛋白；及一HRP (辣根過氧化酶)或一螢光蛋白的一奈米顆粒。

【請求項198】 如請求項181之用於診斷膽管癌的方法，其中該cfDNA更包含由選自由下列組成之群組中之至少任一基因所衍生之一者：*ACPP*、*FLU3*、*CPT1A*、*DSCC1*、*IFNG*、*CD279*、*CD274*、*ERBB2*、*EGFR*、*FOLR1*、*EPCAM*、及其之組合。

【請求項199】 如請求項181之用於診斷膽管癌的方法，其中該標記是在步驟e)中藉由顏色變化、UV吸光度變化、螢光變化、或電化學變化來偵測。

【請求項200】 一種用於診斷膽管癌的診斷套組，包含

一結合有生物素的探針，該探針互補地結合至膽管癌中特異地表現之一基因；

一帶正電材料；

結合有一基於抗生物素蛋白之蛋白質的一標記；及

一手冊，

其中該手冊說明了該套組係構設成能夠在無基因擴增之下藉由下列流程來診斷膽管癌：

a)使用該套組內含的一帶正電材料來單離cfDNA，該cfDNA係來自單離自一個體之一生物樣本；b)在該單離之cfDNA中依序地或同時地混合該套組內含的一結合有生物素的探針與該套組內含的一標記；c)移除未結合至cfDNA之該探針與該標記；及d)偵測該標記的信號。

【請求項201】 如請求項200之診斷套組，其中膽管癌中特異地表現之該基因是選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*MUC16*、*ASH1L*、*DOCK7*、及其之組合。

【請求項202】 如請求項200之診斷套組，其中該套組更包含一結合有生物素的探針，該探針互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*ACPP*、*FLU3*、*CPT1A*、*DSCC1*、*IFNG*、*CD279*、*CD274*、*ERBB2*、*EGFR*、*FOLR1*、*EPCAM*、及其之組合。

【請求項203】 如請求項200之診斷套組，其中該帶正電材料是一帶正電奈米線。

【請求項204】 如請求項203之診斷套組，其中該奈米線包含一導電聚合物。

【請求項205】 如請求項204之診斷套組，其中該奈米線更包含生物素。

【請求項206】 如請求項203之診斷套組，其中該導電聚合物選自由下列組成之群組中之任一者：聚(乙炔)、聚(吡咯)、聚(噻吩)、聚(對苯)、聚(3,4-乙烯二氧基噻吩)、聚(苯硫醚)、聚(對苯伸乙烯)、及聚苯胺。

【請求項207】 如請求項200之診斷套組，其中該標記是包含一導電聚合物；玻尿酸；抗生物素蛋白或鏈黴抗生物素蛋白；及一HRP (辣根過氧化酶)或一螢光蛋白的一奈米顆粒。

【請求項208】 一種用於診斷膽管癌的裝置，其藉由在不擴增之下偵測衍生自來自一樣本的膽管癌細胞之一基因，其中該裝置包含

a)一混合部件，用於將單離自一個體之包含cfDNA的一生物樣本與一帶正電材料混合；

b)一獲取部件，用於移除除結合有cfDNA之該帶正電材料外之該樣本；

c)一反應部件，用於依序地或同時地將一結合有生物素之能夠互補地結合至膽管癌中特異地表現之基因的探針；及包含鏈黴抗生物素蛋白與一標記的一奈米顆粒添加至結合有cfDNA之該帶正電材料；

d)一偵測部件，用於偵測該標記；及

e)一資訊處理部件，用於取決於是否偵測到該標記來判定該樣本中是否存在具有互補於該探針且衍生自膽管癌的一序列之cfDNA。

【請求項209】 如請求項208之用於診斷膽管癌的裝置，其中膽管癌中特異地表現之該基因更包含一結合有生物素的探針，該探針係互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*MUC16*、*ASH1L*、*DOCK7*、及其之組合。

【請求項210】 如請求項209之用於診斷膽管癌的裝置，其中該裝置更包含一結合有生物素的探針，該探針係互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*ACPP*、*FLU3*、*CPT1A*、*DSCC1*、*IFNG*、*CD279*、*CD274*、*ERBB2*、*EGFR*、*FOLR1*、*EPCAM*、及其之組合。

【請求項211】 一種用於診斷胃癌的方法，其藉由在不擴增之下偵測衍生自來自一樣本的胃癌細胞之一基因，其中該方法包含

a)將單離自一個體之包含游離DNA (下稱cfDNA)的一生物樣本與一帶正電材料混合的一步驟；

b)單離結合有cfDNA之該帶正電材料的一步驟；

c)在混合物中依序地或同時地混合具有互補於該cfDNA的一序列之一探針與一標記的一步驟；

d)移除未結合至cfDNA之該探針與該標記的一步驟；及

e)偵測該標記的一步驟，

其中該cfDNA係衍生自胃癌細胞，及

具有互補於cfDNA的一序列之該探針係互補地結合至已知為一胃癌生物標記之一基因。

【請求項212】 如請求項211之用於診斷胃癌的方法，其特徵在於，衍生自胃癌細胞之該cfDNA

i)具有比起具有衍生自正常細胞的一雙螺旋結構之cfDNA所具者較低之一Tm值，或

ii)在具有衍生自正常細胞的一雙螺旋結構之該cfDNA不變性之一條件下變性。

【請求項213】 如請求項211之用於診斷胃癌的方法，其中衍生自胃癌細胞之該cfDNA能夠在下列條件中之任一者與互補地結合至cfDNA之15聚體至30聚體探針結合：

i)在周遭溫度下靜置1分鐘至120分鐘的條件；

ii)在90 °C至95 °C下加熱1秒至3分鐘的條件；

iii)在75 °C至90 °C下加熱1秒至5分鐘的條件；

iv)在60 °C至75 °C下加熱30秒至30分鐘的條件；

v)在25 °C至40 °C下加熱10分鐘至120分鐘的條件；

vi)以蛋白酶處理1分鐘至10分鐘的條件；

vii)以DNase處理1分鐘至10分鐘的條件；及

viii)以化學物質(例如氫氧化鈉、DMSO、表面活性劑等)處理的條件。

【請求項214】 如請求項211之用於診斷胃癌的方法，其中衍生自胃癌細胞之該cfDNA是衍生自胃癌之循環腫瘤DNA。

【請求項215】 如請求項214之用於診斷胃癌的方法，其中具有互補於

cfDNA的一序列之該探針係互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*CGB*、*PARP1*、*FOXO3A*、*MED30*、*CCNE1*、*MYC*、*TFF1*、*FABP1*、*LAMP5*、*MATN3*、*CLIP4*、*NOX4*、*ADRA2C*、*CSK*、*FZD9*、*GALR1*、*GRM6*、*INSR*、*LPHN1*、*LYN*、*MRGPRX3*、*ADCY3*、*HDAC2*、*CFL1*、*NRP2*、*ANXA10*、*TFF2*、*CDCA5*、*NUSAP1*、及其之組合。

【請求項216】 如請求項211之用於診斷胃癌的方法，其特徵在於，該方法更包含在上述步驟c)前，在下列條件中之任一者使結合至該帶正電材料之該樣本或cfDNA變性的一步驟：

i)在周遭溫度下靜置1分鐘至10分鐘的條件；

ii)在90 °C至95 °C下加熱1秒至1分鐘的條件；

iii)在75 °C至90 °C下加熱10秒至3分鐘的條件；

v)在60 °C至75 °C下加熱1分鐘至30分鐘的條件；

v)在25 °C至40 °C下加熱5分鐘至60分鐘的條件；

vi)以蛋白酶處理1分鐘至10分鐘的條件；

vii)以DNase處理1分鐘至10分鐘的條件；及

viii)以化學物質(例如氫氧化鈉、DMSO、表面活性劑等)處理的條件。

【請求項217】 如請求項211之用於診斷胃癌的方法，其中該樣本是選自由下列組成之群組中之任一者：尿液、腦脊髓液、血漿、血液、肋膜積液、腹水、唾液、痰、及體液。

【請求項218】 如請求項211之用於診斷胃癌的方法，其中該帶正電材料是一帶正電奈米線。

【請求項219】 如請求項218之用於診斷胃癌的方法，其中該奈米線包含一導電聚合物。

【請求項220】 如請求項219之用於診斷胃癌的方法，其中該奈米線更包含

生物素。

【請求項221】 如請求項219之用於診斷胃癌的方法，其中該導電聚合物選自由下列組成之群組中之任一者：聚(乙炔)、聚(吡咯)、聚(噻吩)、聚(對苯)、聚(3,4-乙烯二氧基噻吩)、聚(苯硫醚)、聚(對苯伸乙烯)、及聚苯胺。

【請求項222】 如請求項211之用於診斷胃癌的方法，其中該探針是由15聚體至30聚體之核苷酸構成。

【請求項223】 如請求項211之用於診斷胃癌的方法，其中至少一個生物素係結合至該探針。

【請求項224】 如請求項211之用於診斷胃癌的方法，其中該標記是選自由下列組成之群組中之任一者：量子點、HRP (辣根過氧化酶)、螢光蛋白、磷光體、鹼性磷酸酶、及螢光素酶。

【請求項225】 如請求項224之用於診斷胃癌的方法，其中一基於抗生物素蛋白之蛋白質係結合至該標記。

【請求項226】 如請求項224之用於診斷胃癌的方法，其中該基於抗生物素蛋白之蛋白質是選自由下列組成之群組中之任一者：抗生物素蛋白、鏈黴抗生物素蛋白、及其之組合。

【請求項227】 如請求項211之用於診斷胃癌的方法，其中該標記是包含一導電聚合物；玻尿酸；抗生物素蛋白或鏈黴抗生物素蛋白；及一HRP (辣根過氧化酶)或一螢光蛋白的一奈米顆粒。

【請求項228】 如請求項211之用於診斷胃癌的方法，其中該cfDNA更包含由選自由下列組成之群組中之至少任一基因所衍生之一者：*ACPP*、*FLU3*、*KRT19*、*ERBB2*、*EGFR*、*KRAS*、*DSCC1*、*CK20*、*MUC2*、*SDC2*、*COTL1*、*ATAD2*、*ASB9*、*MMP1*、*CEACAM6*、*DSCC1*、*CKS2*、*CST1*、*IFITM1*、*MELK*、*LGALS3BP*、*CPT1A*、*IFNG*、*CD279*、*CD274*、*ERBB2*、*EGFR*、*FOLR1*、*EPCAM*、及其之組

合。

【請求項229】 如請求項211之用於診斷胃癌的方法，其中該標記是在步驟e)中藉由顏色變化、UV吸光度變化、螢光變化、或電化學變化來偵測。

【請求項230】 一種用於診斷胃癌的診斷套組，包含

一結合有生物素的探針，該探針互補地結合至胃癌中特異地表現之一基因；

一帶正電材料；

結合有一基於抗生物素蛋白之蛋白質的一標記；及

一手冊，

其中該手冊說明了該套組係構設成能夠在無基因擴增之下藉由下列流程來診斷胃癌：

a)使用該套組內含的一帶正電材料來單離cfDNA，該cfDNA係來自單離自一個體之一生物樣本；b)在該單離之cfDNA中依序地或同時地混合該套組內含的一結合有生物素的探針與該套組內含的一標記；c)移除未結合至cfDNA之該探針與該標記；及d)偵測該標記的信號。

【請求項231】 如請求項230之診斷套組，其中胃癌中特異地表現之該基因是選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*CGB*、*PARP1*、*FOXO3A*、*MED30*、*CCNE1*、*MYC*、*TFF1*、*FABP1*、*LAMP5*、*MATN3*、*CLIP4*、*NOX4*、*ADRA2C*、*CSK*、*FZD9*、*GALR1*、*GRM6*、*INSR*、*LPHN1*、*LYN*、*MRGPRX3*、*ADCY3*、*HDAC2*、*CFL1*、*NRP2*、*ANXA10*、*TFF2*、*CDCA5*、*NUSAP1*、及其之組合。

【請求項232】 如請求項230之診斷套組，其中該套組更包含一結合有生物素的探針，該探針互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*ACPP*、*FLU3*、*KRT19*、*ERBB2*、*EGFR*、*KRAS*、*DSCC1*、*CK20*、*MUC2*、*SDC2*、*COTL1*、*ATAD2*、*ASB9*、*MMP1*、*CEACAM6*、*DSCC1*、*CKS2*、*CST1*、*IFITM1*、*MELK*、*LGALS3BP*、*CPT1A*、*IFNG*、*CD279*、*CD274*、*ERBB2*、*EGFR*、*FOLR1*、

EPCAM、及其之組合。

【請求項233】 如請求項230之診斷套組，其中該帶正電材料是一帶正電奈米線。

【請求項234】 如請求項233之診斷套組，其中該奈米線包含一導電聚合物。

【請求項235】 如請求項234之診斷套組，其中該奈米線更包含生物素。

【請求項236】 如請求項233之診斷套組，其中該導電聚合物選自由下列組成之群組中之任一者：聚(乙炔)、聚(吡咯)、聚(噻吩)、聚(對苯)、聚(3,4-乙烯二氧基噻吩)、聚(苯硫醚)、聚(對苯伸乙烯)、及聚苯胺。

【請求項237】 如請求項230之診斷套組，其中該標記是包含一導電聚合物；玻尿酸；抗生物素蛋白或鏈黴抗生物素蛋白；及一HRP (辣根過氧化酶)或一螢光蛋白的一奈米顆粒。

【請求項238】 一種用於診斷胃癌的裝置，其藉由在不擴增之下偵測衍生自來自一樣本的胃癌細胞之一基因，其中該裝置包含

a)一混合部件，用於將單離自一個體之包含cfDNA的一生物樣本與一帶正電材料混合；

b)一獲取部件，用於移除除結合有cfDNA之該帶正電材料外之該樣本；

c)一反應部件，用於依序地或同時地將一結合有生物素之能夠互補地結合至胃癌中特異地表現之基因的探針；及包含鏈黴抗生物素蛋白與一標記的一奈米顆粒添加至結合有cfDNA之該帶正電材料；

d)一偵測部件，用於偵測該標記；及

e)一資訊處理部件，用於取決於是否偵測到該標記來判定該樣本中是否存在具有互補於該探針且衍生自胃癌的一序列之cfDNA。

【請求項239】 如請求項238之用於診斷胃癌的裝置，其中胃癌中特異地表

現之該基因更包含一結合有生物素的探針，該探針係互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*CGB*、*PARP1*、*FOXO3A*、*MED30*、*CCNE1*、*MYC*、*TFF1*、*FABP1*、*LAMP5*、*MATN3*、*CLIP4*、*NOX4*、*ADRA2C*、*CSK*、*FZD9*、*GALR1*、*GRM6*、*INSR*、*LPHN1*、*LYN*、*MRGPRX3*、*ADCY3*、*HDAC2*、*CFL1*、*NRP2*、*ANXA10*、*TFF2*、*CDCA5*、*NUSAP1*、及其之組合。

【請求項240】 如請求項239之用於診斷胃癌的裝置，其中該裝置更包含一結合有生物素的探針，該探針係互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*ACPP*、*FLU3*、*KRT19*、*ERBB2*、*EGFR*、*KRAS*、*DSCC1*、*CK20*、*MUC2*、*SDC2*、*COTL1*、*ATAD2*、*ASB9*、*MMP1*、*CEACAM6*、*DSCC1*、*CKS2*、*CST1*、*IFITM1*、*MELK*、*LGALS3BP*、*CPT1A*、*IFNG*、*CD279*、*CD274*、*ERBB2*、*EGFR*、*FOLR1*、*EPCAM*、及其之組合。

【請求項241】 一種用於診斷胰臟癌的方法，其藉由在不擴增之下偵測衍生自來自一樣本的胰臟癌細胞之一基因，其中該方法包含

a)將單離自一個體之包含游離DNA (下稱cfDNA)的一生物樣本與一帶正電材料混合的一步驟；

b)單離結合有cfDNA之該帶正電材料的一步驟；

c)在混合物中依序地或同時地混合具有互補於該cfDNA的一序列之一探針與一標記的一步驟；

d)移除未結合至cfDNA之該探針與該標記的一步驟；及

e)偵測該標記的一步驟，

其中該cfDNA係衍生自胰臟癌細胞，及

具有互補於cfDNA的一序列之該探針係互補地結合至已知為一胰臟癌生物標記之一基因。

【請求項242】 如請求項241之用於診斷胰臟癌的方法，其特徵在於，衍生

自胰臟癌細胞之該cfDNA

i)具有比起具有衍生自正常細胞的一雙螺旋結構之cfDNA所具者較低之一Tm值，或

ii)在具有衍生自正常細胞的一雙螺旋結構之該cfDNA不變性之一條件下變性。

【請求項243】 如請求項241之用於診斷胰臟癌的方法，其中衍生自胰臟癌細胞之該cfDNA能夠在下列條件中之任一者與互補地結合至cfDNA之15聚體至30聚體探針結合：

i)在周遭溫度下靜置1分鐘至120分鐘的條件；

ii)在90 °C至95 °C下加熱1秒至3分鐘的條件；

iii)在75 °C至90 °C下加熱1秒至5分鐘的條件；

iv)在60 °C至75 °C下加熱30秒至30分鐘的條件；

v)在25 °C至40 °C下加熱10分鐘至120分鐘的條件；

vi)以蛋白酶處理1分鐘至10分鐘的條件；

vii)以DNase處理1分鐘至10分鐘的條件；及

viii)以化學物質(例如氫氧化鈉、DMSO、表面活性劑等)處理的條件。

【請求項244】 如請求項241之用於診斷胰臟癌的方法，其中衍生自胰臟癌細胞之該cfDNA是衍生自胰臟癌之循環腫瘤DNA。

【請求項245】 如請求項244之用於診斷胰臟癌的方法，其中具有互補於cfDNA的一序列之該探針係互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*SMAD4*、*APC*、*GNAS*、及其之組合。

【請求項246】 如請求項241之用於診斷胰臟癌的方法，其特徵在於，該方法更包含在上述步驟c)前，在下列條件中之任一者使結合至該帶正電材料之該樣本或cfDNA變性的一步驟：

i)在周遭溫度下靜置1分鐘至10分鐘的條件；

ii)在90 °C至95 °C下加熱1秒至1分鐘的條件；

iii)在75 °C至90 °C下加熱10秒至3分鐘的條件；

v)在60 °C至75 °C下加熱1分鐘至30分鐘的條件；

v)在25 °C至40 °C下加熱5分鐘至60分鐘的條件；

vi)以蛋白酶處理1分鐘至10分鐘的條件；

vii)以DNase處理1分鐘至10分鐘的條件；及

viii)以化學物質(例如氫氧化鈉、DMSO、表面活性劑等)處理的條件。

【請求項247】 如請求項241之用於診斷胰臟癌的方法，其中該樣本是選自由下列組成之群組中之任一者：尿液、腦脊髓液、血漿、血液、肋膜積液、腹水、唾液、痰、及體液。

【請求項248】 如請求項241之用於診斷胰臟癌的方法，其中該帶正電材料是一帶正電奈米線。

【請求項249】 如請求項248之用於診斷胰臟癌的方法，其中該奈米線包含一導電聚合物。

【請求項250】 如請求項249之用於診斷胰臟癌的方法，其中該奈米線更包含生物素。

【請求項251】 如請求項249之用於診斷胰臟癌的方法，其中該導電聚合物選自由下列組成之群組中之任一者：聚(乙炔)、聚(吡咯)、聚(噻吩)、聚(對苯)、聚(3,4-乙烯二氧基噻吩)、聚(苯硫醚)、聚(對苯伸乙烯)、及聚苯胺。

【請求項252】 如請求項241之用於診斷胰臟癌的方法，其中該探針是由15聚體至30聚體之核苷酸構成。

【請求項253】 如請求項241之用於診斷胰臟癌的方法，其中至少一個生物素係結合至該探針。

【請求項254】 如請求項241之用於診斷胰臟癌的方法，其中該標記是選自由下列組成之群組中之任一者：量子點、HRP (辣根過氧化酶)、螢光蛋白、磷光體、鹼性磷酸酶、及螢光素酶。

【請求項255】 如請求項254之用於診斷胰臟癌的方法，其中一基於抗生物素蛋白之蛋白質係結合至該標記。

【請求項256】 如請求項254之用於診斷胰臟癌的方法，其中該基於抗生物素蛋白之蛋白質是選自由下列組成之群組中之任一者：抗生物素蛋白、鏈黴抗生物素蛋白、及其之組合。

【請求項257】 如請求項241之用於診斷胰臟癌的方法，其中該標記是包含一導電聚合物；玻尿酸；抗生物素蛋白或鏈黴抗生物素蛋白；及一HRP (辣根過氧化酶)或一螢光蛋白的一奈米顆粒。

【請求項258】 如請求項241之用於診斷胰臟癌的方法，其中該cfDNA更包含由選自由下列組成之群組中之至少任一基因所衍生之一者：*KRAS*、*MUC1*、*MSLN*、*CEACAM1*、*CEACAM5*、*MUC16*、及其之組合。

【請求項259】 如請求項241之用於診斷胰臟癌的方法，其中該標記是在步驟e)中藉由顏色變化、UV吸光度變化、螢光變化、或電化學變化來偵測。

【請求項260】 一種用於診斷胰臟癌的診斷套組，包含

一結合有生物素的探針，該探針互補地結合至胰臟癌中特異地表現之一基因；

一帶正電材料；

結合有一基於抗生物素蛋白之蛋白質的一標記；及

一手冊，

其中該手冊說明了該套組係構設成能夠在無基因擴增之下藉由下列流程來診斷胰臟癌：

a)使用該套組內含的一帶正電材料來單離cfDNA，該cfDNA係來自單離自一個體之一生物樣本；b)在該單離之cfDNA中依序地或同時地混合該套組內含的一結合有生物素的探針與該套組內含的一標記；c)移除未結合至cfDNA之該探針與該標記；及d)偵測該標記的信號。

【請求項261】 如請求項260之診斷套組，其中胰臟癌中特異地表現之該基因是選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*SMAD4*、*APC*、*GNAS*、及其之組合。

【請求項262】 如請求項260之診斷套組，其中該套組更包含一結合有生物素的探針，該探針互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*KRAS*、*MUC1*、*MSLN*、*CEACAM1*、*CEACAM5*、*MUC16*、及其之組合。

【請求項263】 如請求項260之診斷套組，其中該帶正電材料是一帶正電奈米線。

【請求項264】 如請求項263之診斷套組，其中該奈米線包含一導電聚合物。

【請求項265】 如請求項264之診斷套組，其中該奈米線更包含生物素。

【請求項266】 如請求項263之診斷套組，其中該導電聚合物選自由下列組成之群組中之任一者：聚(乙炔)、聚(吡咯)、聚(噻吩)、聚(對苯)、聚(3,4-乙烯二氧基噻吩)、聚(苯硫醚)、聚(對苯伸乙烯)、及聚苯胺。

【請求項267】 如請求項260之診斷套組，其中該標記是包含一導電聚合物；玻尿酸；抗生物素蛋白或鏈黴抗生物素蛋白；及一HRP (辣根過氧化酶)或一螢光蛋白的一奈米顆粒。

【請求項268】 一種用於診斷胰臟癌的裝置，其藉由在不擴增之下偵測衍生自來自一樣本的胰臟癌細胞之一基因，其中該裝置包含

a)一混合部件，用於將單離自一個體之包含cfDNA的一生物樣本與一帶正電

材料混合；

b)一獲取部件，用於移除除結合有cfDNA之該帶正電材料外之該樣本；

c)一反應部件，用於依序地或同時地將一結合有生物素之能夠互補地結合至胰臟癌中特異地表現之基因的探針；及包含鏈黴抗生物素蛋白與一標記的一奈米顆粒添加至結合有cfDNA之該帶正電材料；

d)一偵測部件，用於偵測該標記；及

e)一資訊處理部件，用於取決於是否偵測到該標記來判定該樣本中是否存在具有互補於該探針且衍生自胰臟癌的一序列之cfDNA。

【請求項269】 如請求項268之用於診斷胰臟癌的裝置，其中胰臟癌中特異地表現之該基因更包含一結合有生物素的探針，該探針係互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*SMAD4*、*APC*、*GNAS*、及其之組合。

【請求項270】 如請求項269之用於診斷胰臟癌的裝置，其中該裝置更包含一結合有生物素的探針，該探針係互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*KRAS*、*MUC1*、*MSLN*、*CEACAM1*、*CEACAM5*、*MUC16*、及其之組合。

【請求項271】 一種用於早期診斷癌症或預測癌症預後的方法，其藉由在不擴增之下偵測衍生自來自一樣本的癌細胞之一基因，其中該方法包含

a)將單離自一個體之包含游離DNA (下稱cfDNA)的一生物樣本與一帶正電材料混合的一步驟；

b)單離結合有cfDNA之該帶正電材料的一步驟；

c)在混合物中依序地或同時地混合具有互補於該cfDNA的一序列之一探針與一標記的一步驟；

d)移除未結合至cfDNA之該探針與該標記的一步驟；及

e)偵測該標記的一步驟，

其中該cfDNA係衍生自癌細胞，及

具有互補於cfDNA的一序列之該探針係互補地結合至已知為一癌症生物標記之一基因。

【請求項272】 如請求項271之用於早期診斷癌症或預測癌症預後的方法，其特徵在於，衍生自癌細胞之該cfDNA

i)具有比起具有衍生自正常細胞的一雙螺旋結構之cfDNA所具者較低之一Tm值，或

ii)在具有衍生自正常細胞的一雙螺旋結構之該cfDNA不變性之一條件下變性。

【請求項273】 如請求項271之用於早期診斷癌症或預測癌症預後的方法，其中衍生自癌細胞之該cfDNA能夠在下列條件中之任一者與互補地結合至cfDNA之15聚體至30聚體探針結合：

i)在周遭溫度下靜置1分鐘至120分鐘的條件；

ii)在90 °C至95 °C下加熱1秒至3分鐘的條件；

iii)在75 °C至90 °C下加熱1秒至5分鐘的條件；

iv)在60 °C至75 °C下加熱30秒至30分鐘的條件；

v)在25 °C至40 °C下加熱10分鐘至120分鐘的條件；

vi)以蛋白酶處理1分鐘至10分鐘的條件；

vii)以DNase處理1分鐘至10分鐘的條件；及

viii)以化學物質(例如氫氧化鈉、DMSO、表面活性劑等)處理的條件。

【請求項274】 如請求項271之用於早期診斷癌症或預測癌症預後的方法，其中衍生自癌細胞之該cfDNA是衍生自癌症之循環腫瘤DNA。

【請求項275】 如請求項274之用於早期診斷癌症或預測癌症預後的方法，其中具有互補於cfDNA的一序列之該探針係互補地結合至選自由下列組成之群

組中之至少任一基因：*CPT1A*、*IFNG*、*IFNGR1*、*CD279*、*CD274*、及其之組合。

【請求項276】 如請求項271之用於早期診斷癌症或預測癌症預後的方法，其特徵在於，該方法更包含在上述步驟c)前，在下列條件中之任一者使結合至該帶正電材料之該樣本或cfDNA變性的一步驟：

i)在周遭溫度下靜置1分鐘至10分鐘的條件；

ii)在90 °C至95 °C下加熱1秒至1分鐘的條件；

iii)在75 °C至90 °C下加熱10秒至3分鐘的條件；

v)在60 °C至75 °C下加熱1分鐘至30分鐘的條件；

v)在25 °C至40 °C下加熱5分鐘至60分鐘的條件；

vi)以蛋白酶處理1分鐘至10分鐘的條件；

vii)以DNase處理1分鐘至10分鐘的條件；及

viii)以化學物質(例如氫氧化鈉、DMSO、表面活性劑等)處理的條件。

【請求項277】 如請求項271之用於早期診斷癌症或預測癌症預後的方法，其中該樣本是選自由下列組成之群組中之任一者：尿液、腦脊髓液、血漿、血液、肋膜積液、腹水、唾液、痰、及體液。

【請求項278】 如請求項271之用於早期診斷癌症或預測癌症預後的方法，其中該帶正電材料是一帶正電奈米線。

【請求項279】 如請求項278之用於早期診斷癌症或預測癌症預後的方法，其中該奈米線包含一導電聚合物。

【請求項280】 如請求項279之用於早期診斷癌症或預測癌症預後的方法，其中該奈米線更包含生物素。

【請求項281】 如請求項279之用於早期診斷癌症或預測癌症預後的方法，其中該導電聚合物選自由下列組成之群組中之任一者：聚(乙炔)、聚(吡咯)、聚(噻吩)、聚(對苯)、聚(3,4-乙烯二氧基噻吩)、聚(苯硫醚)、聚(對苯伸乙烯)、及聚

苯胺。

【請求項282】 如請求項271之用於早期診斷癌症或預測癌症預後的方法，其中該探針是由15聚體至30聚體之核苷酸構成。

【請求項283】 如請求項271之用於早期診斷癌症或預測癌症預後的方法，其中至少一個生物素係結合至該探針。

【請求項284】 如請求項271之用於早期診斷癌症或預測癌症預後的方法，其中該標記是選自由下列組成之群組中之任一者：量子點、HRP (辣根過氧化酶)、螢光蛋白、磷光體、鹼性磷酸酶、及螢光素酶。

【請求項285】 如請求項284之用於早期診斷癌症或預測癌症預後的方法，其中一基於抗生物素蛋白之蛋白質係結合至該標記。

【請求項286】 如請求項284之用於早期診斷癌症或預測癌症預後的方法，其中該基於抗生物素蛋白之蛋白質是選自由下列組成之群組中之任一者：抗生物素蛋白、鏈黴抗生物素蛋白、及其之組合。

【請求項287】 如請求項271之用於早期診斷癌症或預測癌症預後的方法，其中該標記是包含一導電聚合物；玻尿酸；抗生物素蛋白或鏈黴抗生物素蛋白；及一HRP (辣根過氧化酶)或螢光蛋白的奈米顆粒。

【請求項288】 如請求項271之用於早期診斷癌症或預測癌症預後的方法，其中該cfDNA更包含由選自由下列組成之群組中之至少任一基因所衍生之一者：*NSE*、*SCC*、*CEA*、*cyfra21-1*、*TPA*、*NMP22*、*OGT*、*甲狀腺球蛋白(TG)*、*抑鈣素(CALCA)*、*BRAF V600E*、*TERT C228T/C250T*、*AFP*、*β-HCG(CGB)*、*CA19-9*、*PSA*、*PSMA*、*PAP*、*PCA3*、*TMPRSS2-ERG*、*CA125*、*HIF-1a*、*VEGF*、*CA15-3*、*HER2*、*SCC(SART3)*、*TOP2A*、*MCM2*、*p16INK4a(CDKN2A)*、*Ki-67(MKI167)*、*HE4(WEDC2)*、及其之組合。

【請求項289】 如請求項271之用於早期診斷癌症或預測癌症預後的方法，

其中該標記是在步驟e)中藉由顏色變化、UV吸光度變化、螢光變化、或電化學變化來偵測。

【請求項290】 一種用於早期診斷癌症或預測癌症預後的診斷套組，包含

一結合有生物素的探針，該探針互補地結合至癌症中特異地表現之一基因；

一帶正電材料；

結合有一基於抗生物素蛋白之蛋白質的一標記；及

一手冊，

其中該手冊說明了該套組係構設成能夠在無基因擴增之下藉由下列流程來診斷癌症：

a)使用該套組內含的一帶正電材料來單離cfDNA，該cfDNA係來自單離自一個體之一生物樣本；b)在該單離之cfDNA中依序地或同時地混合該套組內含的一結合有生物素的探針與該套組內含的一標記；c)移除未結合至cfDNA之該探針與該標記；及d)偵測該標記的信號。

【請求項291】 如請求項290之用於早期診斷癌症或預測癌症預後的診斷套組，其中癌症中特異地表現之該基因是選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*CPT1A*、*IFNG*、*IFNGR1*、*CD279*、*CD274*、及其之組合。

【請求項292】 如請求項290之用於早期診斷癌症或預測癌症預後的診斷套組，其中該套組更包含一結合有生物素的探針，該探針互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*NSE*、*SCC*、*CEA*、*cyfra21-1*、*TPA*、*NMP22*、*OGT*、*甲狀腺球蛋白(TG)*、*抑鈣素(CALCA)*、*BRAF V600E*、*TERT C228T/C250T*、*AFP*、*β-HCG(CGB)*、*CA19-9*、*PSA*、*PSMA*、*PAP*、*PCA3*、*TMPRSS2-ERG*、*CA125*、*HIF-1a*、*VEGF*、*CA15-3*、*HER2*、*SCC(SART3)*、*TOP2A*、*MCM2*、*p16INK4a(CDKN2A)*、*Ki-67(MKI167)*、*HE4(WEDC2)*、及其之組合。

【請求項293】 如請求項290之用於早期診斷癌症或預測癌症預後的診斷

套組，其中該帶正電材料是一帶正電奈米線。

【請求項294】 如請求項293之用於早期診斷癌症或預測癌症預後的診斷套組，其中該奈米線包含一導電聚合物。

【請求項295】 如請求項294之用於早期診斷癌症或預測癌症預後的診斷套組，其中該奈米線更包含生物素。

【請求項296】 如請求項293之用於早期診斷癌症或預測癌症預後的診斷套組，其中該導電聚合物選自由下列組成之群組中之任一者：聚(乙炔)、聚(吡咯)、聚(噻吩)、聚(對苯)、聚(3,4-乙烯二氧基噻吩)、聚(苯硫醚)、聚(對苯伸乙烯)、及聚苯胺。

【請求項297】 如請求項290之用於早期診斷癌症或預測癌症預後的診斷套組，其中該標記是包含一導電聚合物；玻尿酸；抗生物素蛋白或鏈黴抗生物素蛋白；及一HRP (辣根過氧化酶)或一螢光蛋白的一奈米顆粒。

【請求項298】 一種用於早期診斷癌症或預測癌症預後的裝置，其藉由在不擴增之下偵測衍生自來自一樣本的癌細胞之一基因，其中該裝置包含

a)一混合部件，用於將單離自一個體之包含cfDNA的一生物樣本與一帶正電材料混合；

b)一獲取部件，用於移除除結合有cfDNA之該帶正電材料外之該樣本；

c)一反應部件，用於依序地或同時地將一結合有生物素之能夠互補地結合至癌症中特異地表現之基因的探針；及包含鏈黴抗生物素蛋白與一標記的一奈米顆粒添加至結合有cfDNA之該帶正電材料；

d)一偵測部件，用於偵測該標記；及

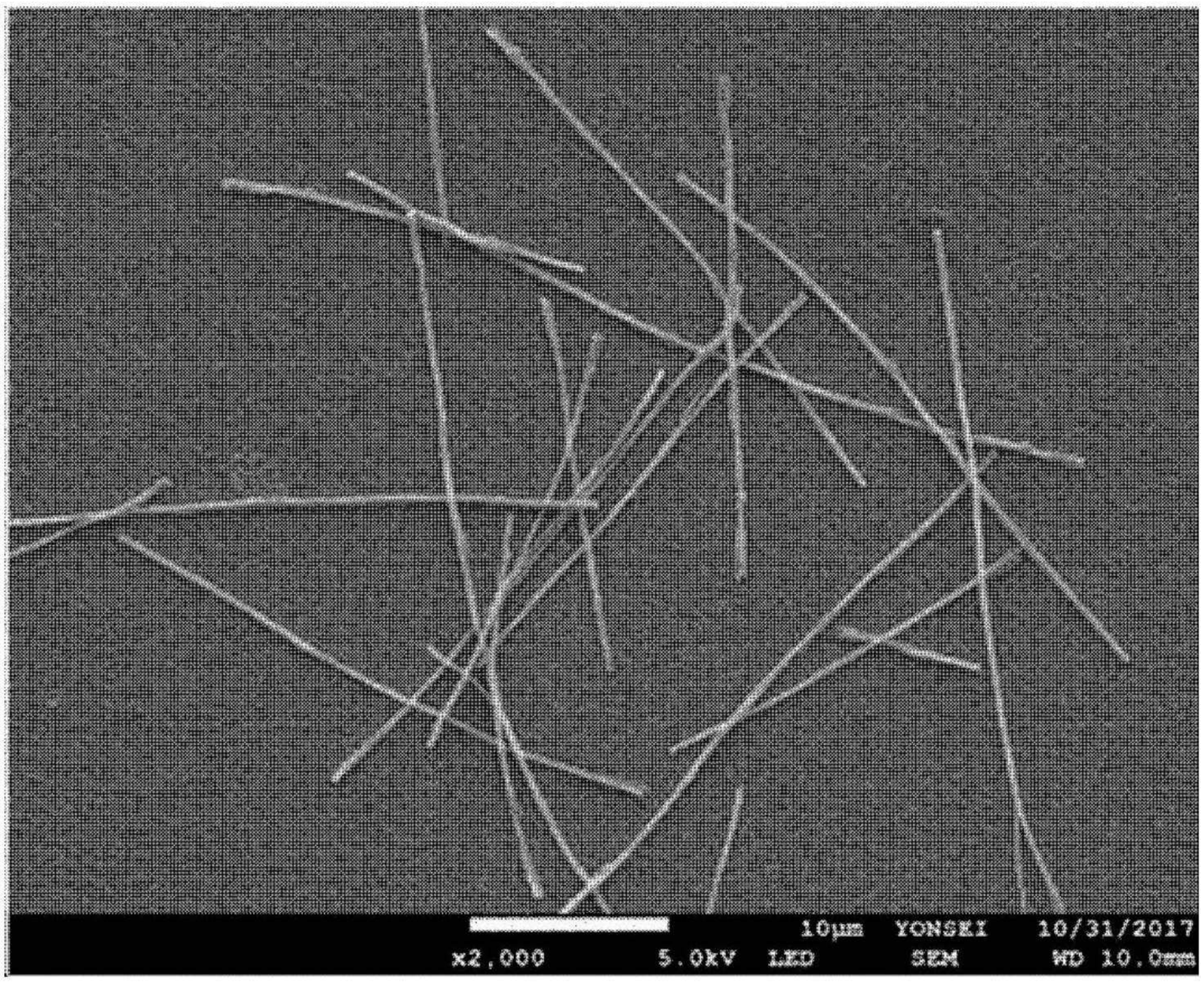
e)一資訊處理部件，用於取決於是否偵測到該標記來判定該樣本中是否存在具有互補於該探針且衍生自癌症的一序列之cfDNA。

【請求項299】 如請求項298之用於早期診斷癌症或預測癌症預後的裝置，

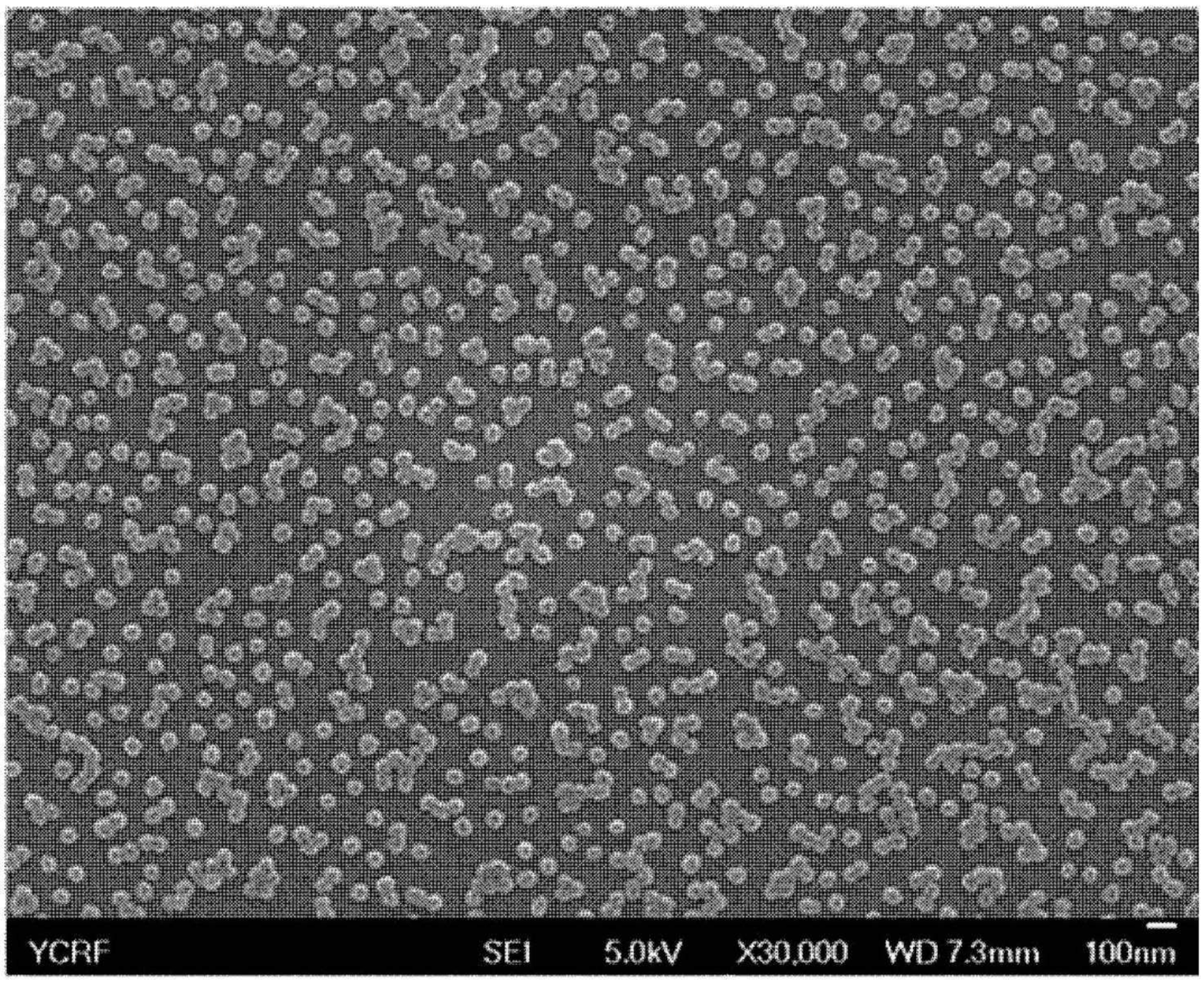
其中癌症中特異地表現之該基因更包含一結合有生物素的探針，該探針係互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*CPT1A*、*IFNG*、*IFNGR1*、*CD279*、*CD274*、及其之組合。

【請求項300】 如請求項299之用於早期診斷癌症或預測癌症預後的裝置，其中該裝置更包含一結合有生物素的探針，該探針係互補地結合至選自由下列組成之群組中之至少任一基因：*NSE*、*SCC*、*CEA*、*cyfra21-1*、*TPA*、*NMP22*、*OGT*、*甲狀腺球蛋白(TG)*、*抑鈣素(CALCA)*、*BRAF V600E*、*TERT C228T/C250T*、*AFP*、*β-HCG(CGB)*、*CA19-9*、*PSA*、*PSMA*、*PAP*、*PCA3*、*TMPRSS2-ERG*、*CA125*、*HIF-1a*、*VEGF*、*CA15-3*、*HER2*、*SCC(SART3)*、*TOP2A*、*MCM2*、*p16INK4a(CDKN2A)*、*Ki-67(MKI167)*、*HE4(WEDC2)*、及其之組合。

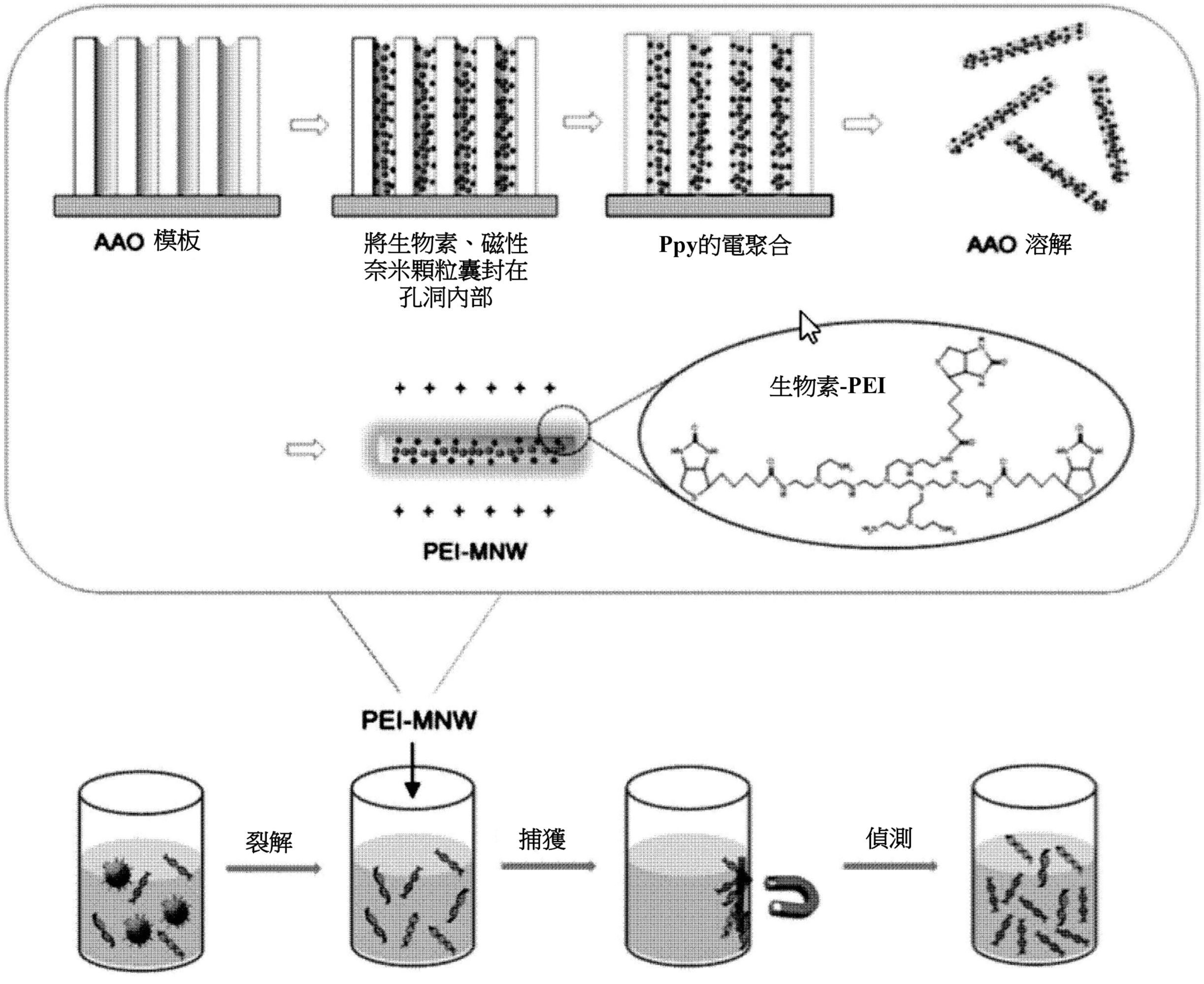
【發明圖式】


10μm YONSEI 10/31/2017
x2,000 5.0kV LED SEM WD 10.0mm

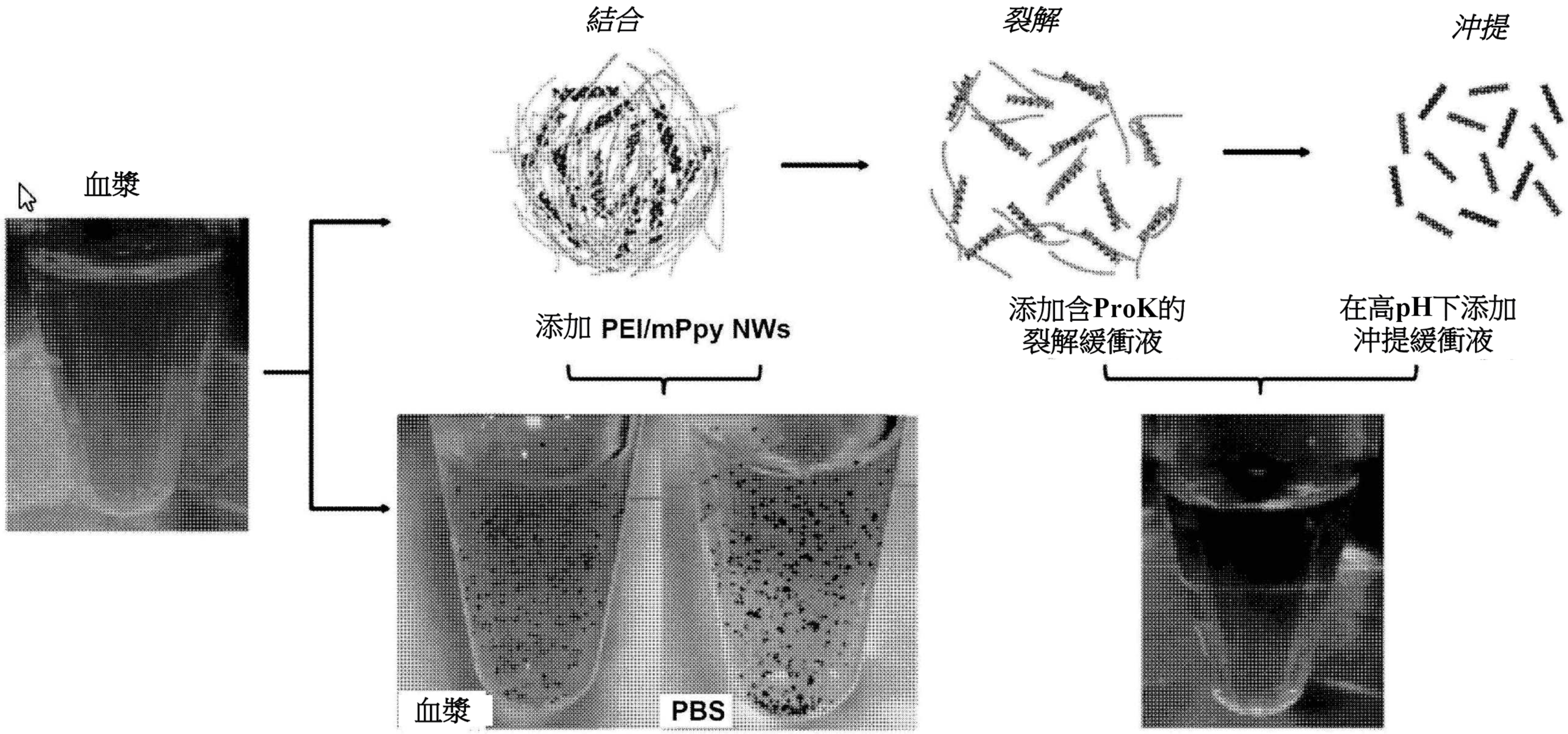
【圖1a】


YCRF SEI 5.0kV X30,000 WD 7.3mm 100nm

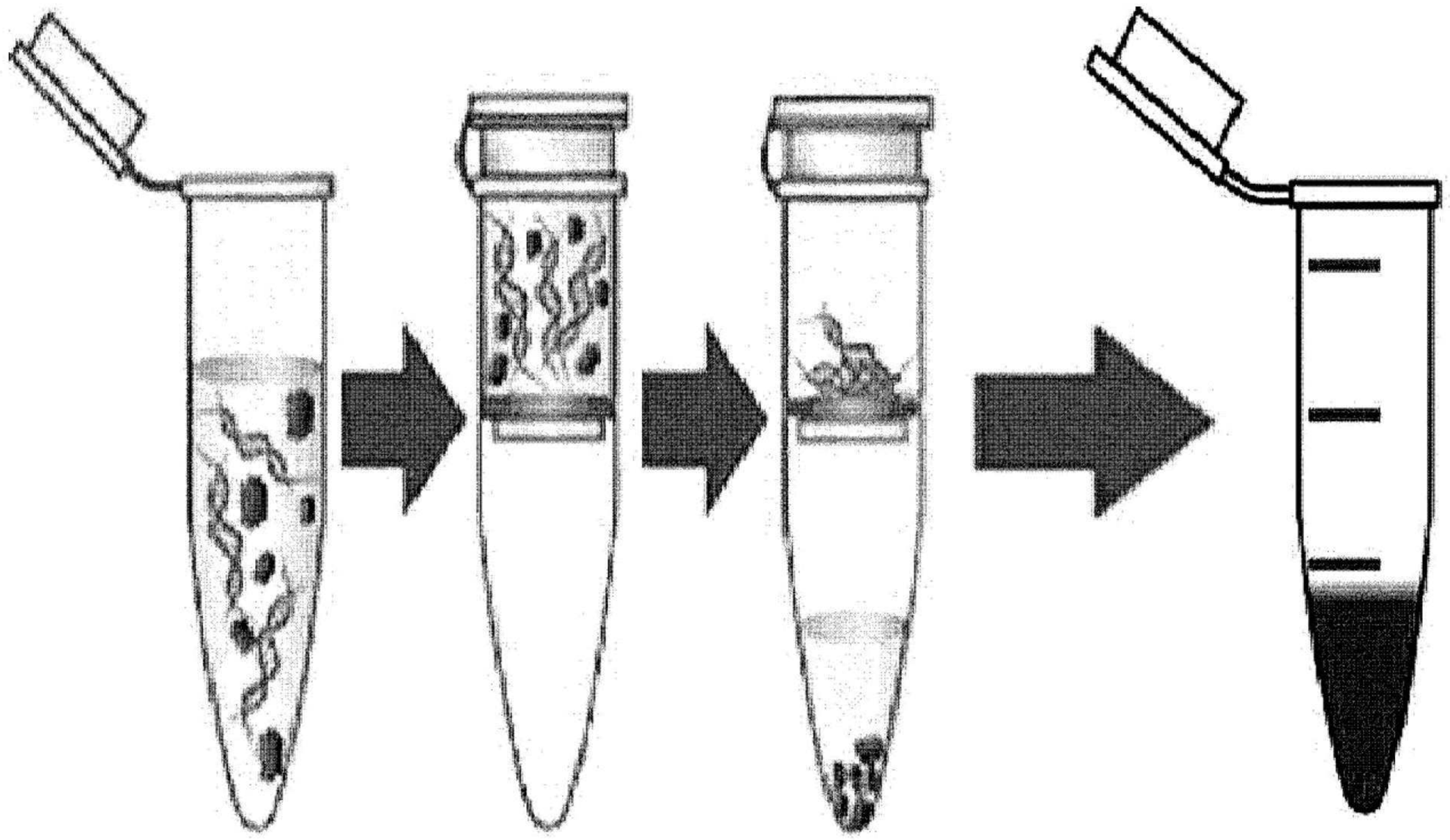
【圖1b】


AAO 模板
將生物素、磁性
奈米顆粒囊封在
孔洞內部
Ppy的電聚合
AAO 溶解
生物素-PEI
PEI-MNW
PEI-MNW
裂解
捕獲
偵測

【圖2a】


血漿
結合
裂解
沖提
添加 PEI/mPpy NWs
添加含ProK的
裂解緩衝液
在高pH下添加
沖提緩衝液
血漿
PBS

【圖2b】



【圖3】

#1

	PD-L1 高度表現					PD-L1 低度表現			
波長	MDA MB 231	HCC827	H1975	PC9	H460	A549	MDA MB 468	HeLa	MCF7
500	0.052	0.049	0.047	0.046	0.045	0.038	0.039	0.039	0.04
650	0.105	0.096	0.085	0.079	0.066	0.037	0.041	0.037	0.038
PDL1 DNA 表現 (ΔOD)	0.053	0.047	0.038	0.033	0.021	-0.001	0.002	-0.002	-0.002
PDL1 mRNA 表現 (CCLE)	3.47	3.42	2.1	1.1	0.9	0.74	-0.39	-1.27	-4.06
ΔOD 圖表									

【圖4】

#2

		PD-L1 高度表現					PD-L1 低度表現		
波長	MDA MB 231	HCC827	H1975	PC9	H460	A549	MDA MB 468	HeLa	MCF7
500	0.05	0.047	0.046	0.044	0.044	0.038	0.039	0.04	0.04
650	0.09	0.081	0.075	0.066	0.059	0.037	0.04	0.038	0.038
PD-L1 DNA 表現 (ΔOD)	0.04	0.034	0.029	0.022	0.015	-0.001	0.001	-0.002	-0.002
PD-L1 mRNA 表現 (CCLE)	3.47	3.42	2.1	1.1	0.9	0.74	-0.39	-1.27	-4.06
ΔOD 圖表									

【圖5】

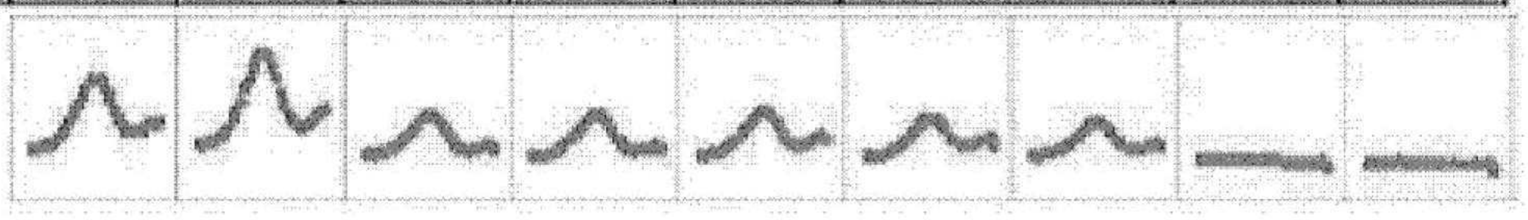
#1

	高度EpCAM表現					低度EpCAM 表現	
波長	HCC827	MCF7	H1975	MDA-MB-231	A549	H460	HeLa
500	0.046	0.044	0.044	0.044	0.04	0.04	0.04
650	0.079	0.07	0.073	0.064	0.038	0.041	0.04
EpCAM DNA 表現 (ΔOD)	0.033	0.026	0.029	0.02	-0.002	0.001	0
EpCAM mRNA 表現 (CCLE)	7.39	7.5	6.24	3.334	1.73	-0.48	-0.007
ΔOD 圖表							

【圖6】

#2

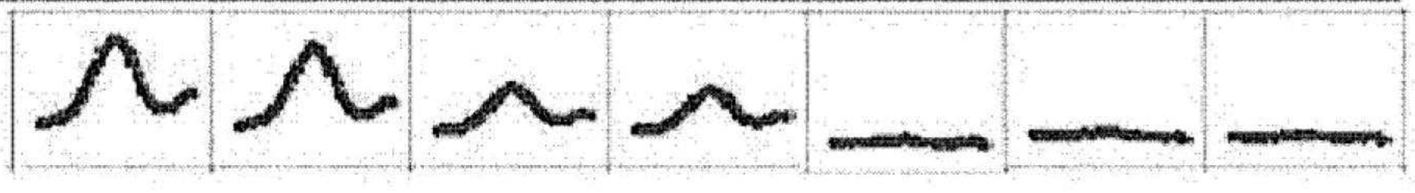
高度EpCAM表現　　低度EpCAM表現

波長	PC9	MDA MB 468	HCC827	MCF7	H1975	MDA MB 231	A549	H460	HeLa
500	0.05	0.054	0.046	0.045	0.045	0.045	0.045	0.042	0.04
650	0.102	0.121	0.075	0.074	0.077	0.072	0.069	0.043	0.04
EpCAM DNA 表現 (ΔOD)	0.052	0.067	0.029	0.029	0.032	0.027	0.024	0.001	0
EpCAM mRNA 表現 (CCLE)	7.69	7.39	7.39	7.5	6.24	3.334	1.73	-0.48	-0.007
ΔOD 圖表									

【圖7】

#1

FOLR1 高度表現　　FOLR1 低度表現

波長	HeLa	HCC827	MCF7	MDA-MB-231	H1975	A549	H460
500	0.055	0.052	0.048	0.048	0.041	0.043	0.041
650	0.141	0.132	0.092	0.089	0.045	0.046	0.043
FOLR1 DNA 表現 (△OD)	0.086	0.08	0.044	0.041	0.004	0.003	0.002
FOLR1 mRNA 表現 (CCLE)	6.76	2.14	1.14	0.93	-2.13	-2.68	-4.67
ΔOD 圖表							

【圖8】

#2

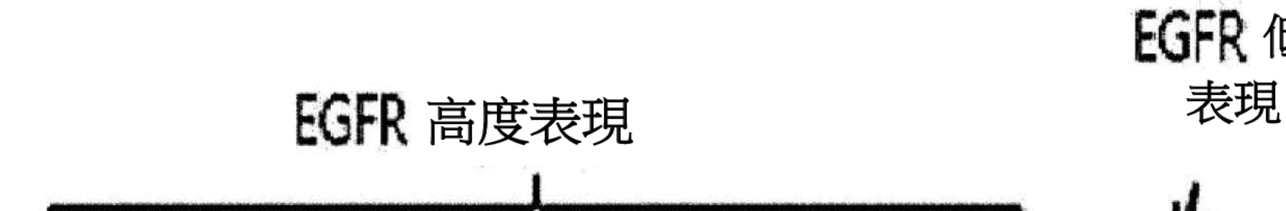
FOLR1 高度表現　　FOLR1 低度表現

波長	HeLa	HCC827	MCF7	MDA-MB-468	MDA-MB-231	PC9	H1975	A549	H460
500	0.049	0.049	0.047	0.044	0.044	0.042	0.04	0.04	0.04
650	0.089	0.086	0.082	0.062	0.066	0.051	0.042	0.039	0.041
FOLR1 DNA 表現 (△OD)	0.04	0.037	0.035	0.016	0.022	0.009	0.002	-0.001	0.001
FOLR1 mRNA 表現 (CCLE)	6.75	4.98	1.13	1.02	0.93	-1.36	-2.12	-2.67	-4.67
ΔOD 圖表									

【圖9】

#1

EGFR 高度表現　　EGFR 低度表現

波長	HCC827	MDA-MB-231	A549	H1975	HeLa	H460	MCF7
500	0.048	0.045	0.046	0.041	0.043	0.043	0.043
650	0.098	0.079	0.067	0.052	0.066	0.048	0.043
EGFR DNA 表現 (△OD)	0.05	0.034	0.021	0.011	0.028	0.005	0
EGFR mRNA 表現 (CCLE)	8.98	5.06	4.77	4.72	3.54	2.29	-2.61
ΔOD 圖表							

【圖10】

#2

EGFR 高度表現　　EGFR 低度表現

波長	HCC827	MDA-MB-468	PC9	MDA-MB-231	A549	H1975	HeLa	H460	MCF7
500	0.051	0.048	0.045	0.045	0.046	0.043	0.041	0.039	0.045
650	0.094	0.079	0.069	0.07	0.077	0.057	0.045	0.039	0.043
EGFR DNA 表現 (ΔOD)	0.043	0.031	0.024	0.025	0.031	0.014	0.004	0	-0.002
EGFR mRNA 表現 (CCLE)	8.98	8.51	6.75	5.05	4.77	4.72	3.54	2.29	-2.61
ΔOD 圖表									

【圖11】

#1

ERBB2 高度表現

波長	MCF7	H1975	HeLa	HCC827	MDA-MB-231	A549	H460
500	0.049	0.047	0.047	0.045	0.044	0.041	0.041
650	0.098	0.088	0.086	0.076	0.069	0.054	0.047
ERBB2 DNA 表現 (△OD)	0.049	0.041	0.039	0.031	0.025	0.013	0.006
ERBB2 mRNA 表現 (CCLE)	4.65	4.31	4.06	4.08	3.68	3.29	2.95

【圖12】

#2

ERBB2 高度表現

波長	MCF7	H1975	PC9	HeLa	HCC827	MDA MB468	MDA M8231	A549	H460
500	0.056	0.047	0.046	0.048	0.046	0.043	0.043	0.041	0.044
650	0.116	0.087	0.082	0.093	0.086	0.064	0.061	0.052	0.047
ERBB2 DNA 表現 (ΔOD)	0.06	0.04	0.036	0.045	0.04	0.021	0.018	0.011	0.003
ERBB2 mRNA 表現 (CCLE)	4.65	4.31	4.06	4.06	4.08	3.58	3.68	3.29	2.95



【圖13】

#1

膀胱癌細胞株(小鼠)

膀胱癌細胞株(人類)

良性膀胱癌細胞(人類)

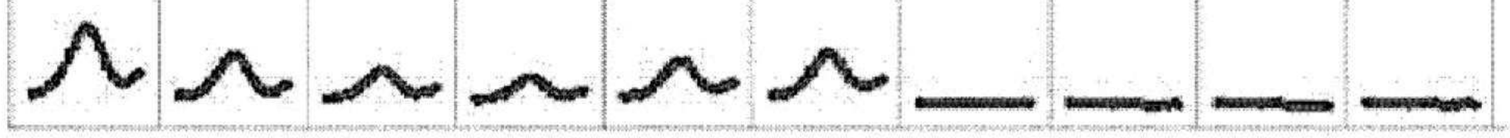
正常膀胱細胞

犬

人類

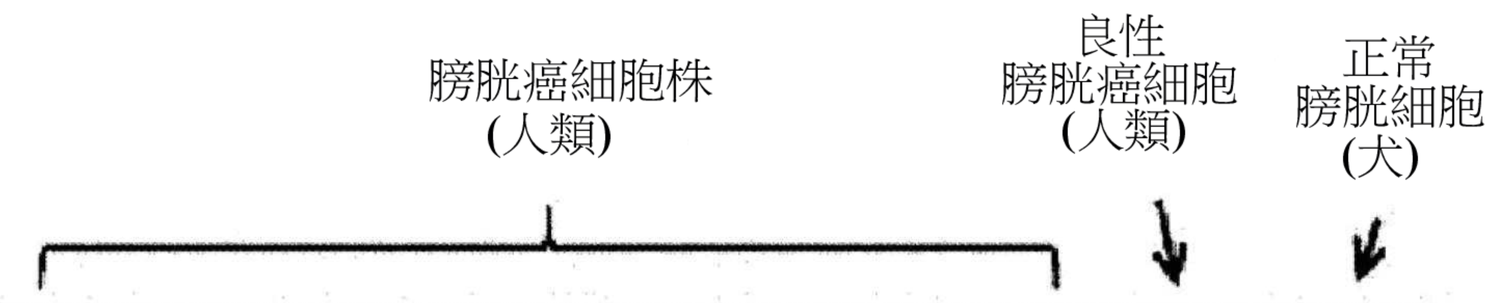
T淋巴球細胞(人類)

波長	UM UC 3	KU 19-19	253J	J82	T24	NBT2	RT4	MDCK	HBL EpC	Jurkat
500	0.051	0.048	0.044	0.043	0.047	0.049	0.039	0.039	0.039	0.04
650	0.132	0.097	0.079	0.069	0.09	0.1	0.039	0.038	0.039	0.038
OGT DNA 表現 (ΔOD)	0.081	0.049	0.085	0.026	0.043	0.051	0	-0.001	0	-0.002

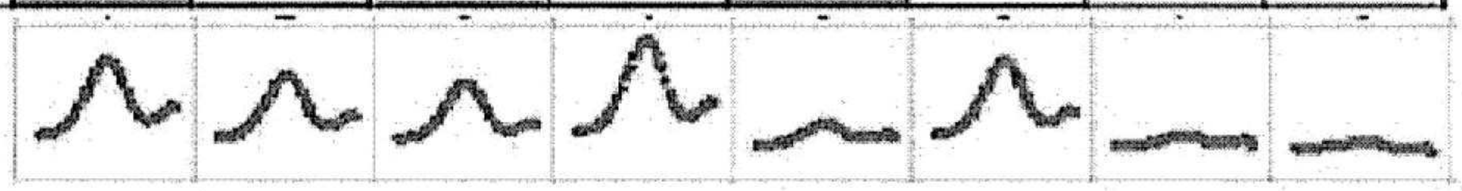


【圖14】

#2

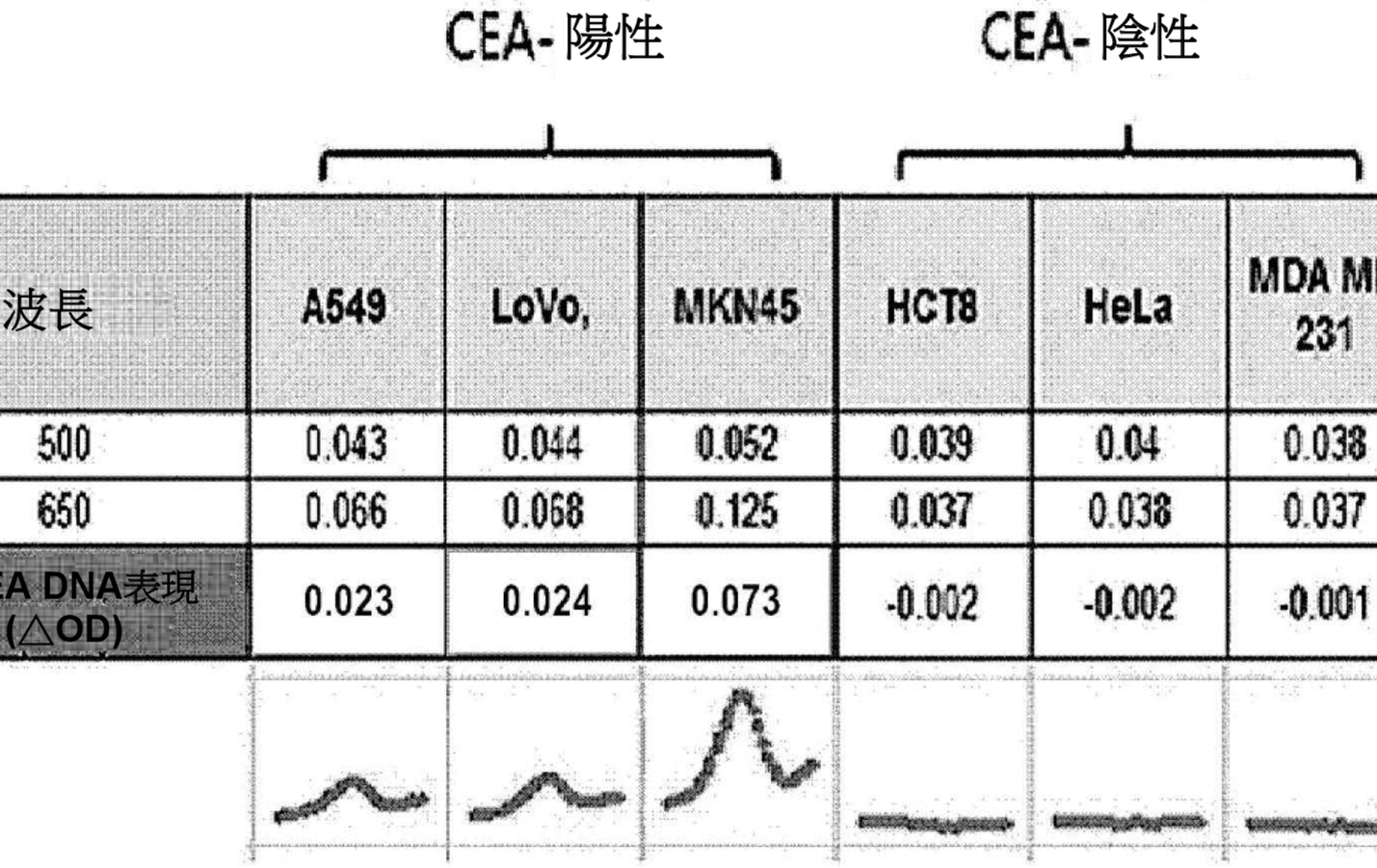


波長	UMUC3	KU1919	253J	T24	MBT2	J82	RT4	MDCK
500	0.052	0.049	0.048	0.055	0.043	0.052	0.043	0.04
650	0.118	0.104	0.096	0.135	0.061	0.117	0.051	0.045
OGT DNA 表現 (ΔOD)	0.066	0.055	0.048	0.08	0.018	0.065	0.008	0.005



【圖15】

#1

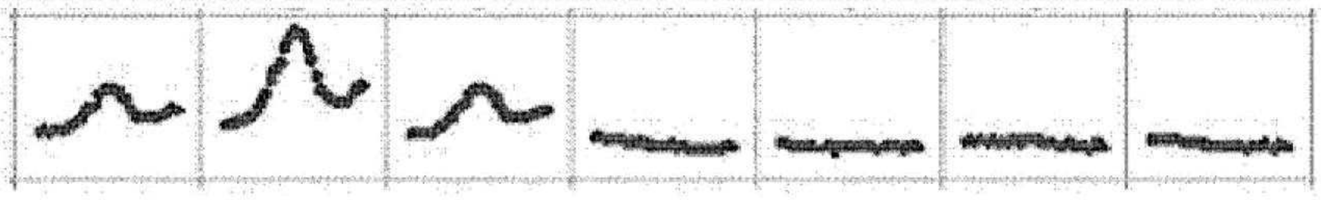


波長	A549	LoVo,	MKN45	HCT8	HeLa	MDA MB 231
500	0.043	0.044	0.052	0.039	0.04	0.038
650	0.066	0.068	0.125	0.037	0.038	0.037
CEA DNA表現 (△OD)	0.023	0.024	0.073	-0.002	-0.002	-0.001

【圖16】

#2

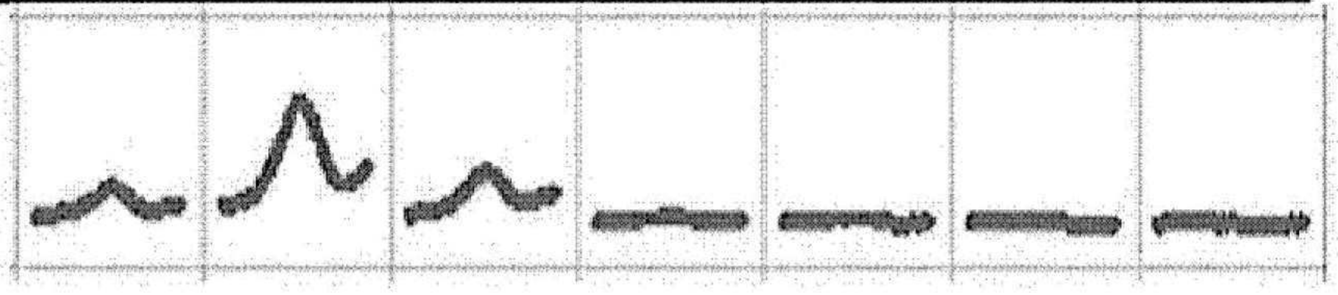
波長	LoVo	MKN45	SW1116	HCT8	HCT15	HeLA	MDA MB 231
500	0.042	0.044	0.041	0.04	0.038	0.039	0.039
650	0.056	0.073	0.056	0.037	0.038	0.04	0.038
CEA DNA表現 (△OD)	0.014	0.029	0.015	-0.003	0	0.001	-0.001



【圖17】

#3

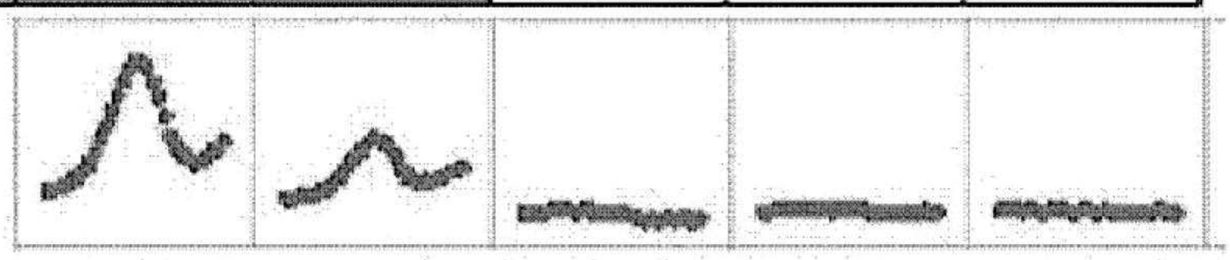
波長	LoVo	MKN45	SW1116	HCT8	HCT15	HeLA	MDA MB231
500	0.043	0.05	0.044	0.039	0.039	0.039	0.039
650	0.061	0.115	0.071	0.043	0.042	0.04	0.039
CEA DNA表現 (△OD)	0.018	0.085	0.027	0.004	0.003	0.001	0



【圖18】

#1

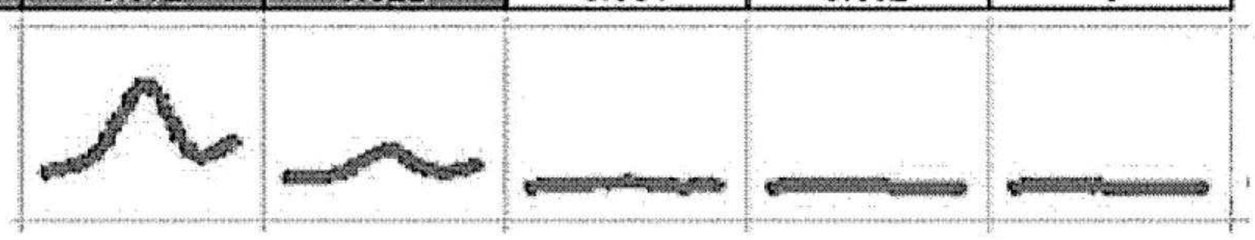
	PSA-陽性		PSA-陰性		
波長	LN3	LNCaP	PC3	DU145	MCF7
500	0.047	0.043	0.038	0.038	0.039
650	0.099	0.067	0.037	0.039	0.039
PSA DNA 表現 (△OD)	0.052	0.024	-0.001	0.001	0



【圖19】

#2

	PSA-陽性		PSA-陰性		
波長	LN3	LNcap	PC3	DU145	MCF7
490	0.05	0.045	0.038	0.038	0.038
650	0.122	0.067	0.042	0.04	0.038
PSA DNA 表現 (△OD)	0.072	0.022	0.004	0.002	0

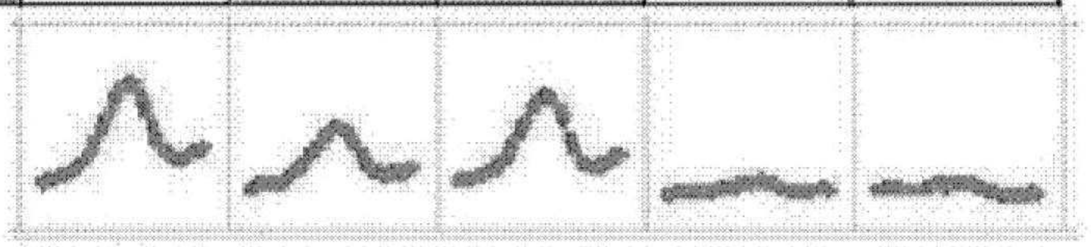


【圖20】

#1

CA19-9 - 陽性　　CA19-9 - 陰性

波長	Capan1	Capan2	AsPC1	MIA-PaCa2	Panc1
500	0.045	0.042	0.045	0.04	0.041
650	0.081	0.065	0.077	0.043	0.043
CA19-9 DNA 表現 (△OD)	**0.036**	**0.023**	**0.032**	0.003	0.002

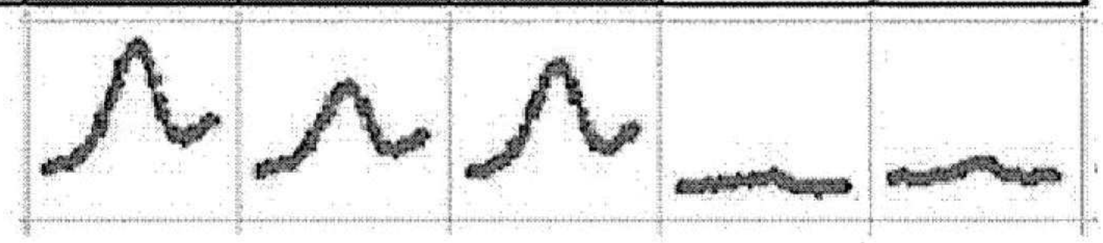


【圖21】

#2

CA19-9 - 陽性　　CA19-9 - 陰性

波長	Capan1	Capan2	AsPC1	MIA-PaCa2	Panc1
500	0.047	0.046	0.045	0.039	0.042
650	0.094	0.078	0.086	0.042	0.048
CA19-9 DNA 表現 (△OD)	**0.047**	**0.032**	**0.041**	0.003	0.006

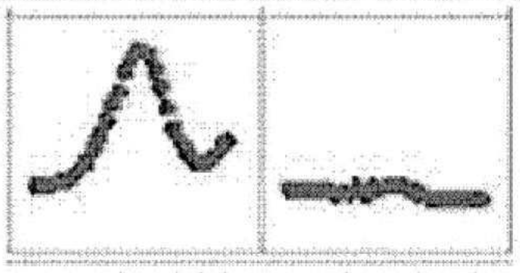


【圖22】

#1

CA125 陽性　　CA125 陰性

波長	A549	A431
500	0.048	0.047
650	0.093	0.047
CA125 DNA 表現 (ΔOD)	0.045	0

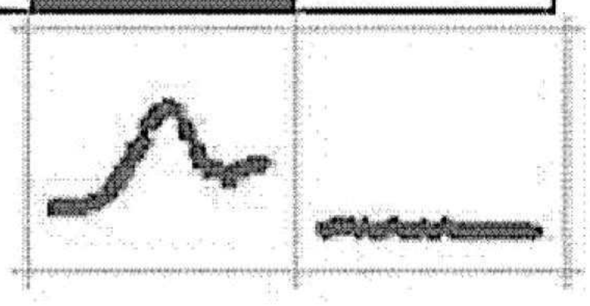


【圖23】

#2

CA125 陽性　　CA125 陰性

波長	A549	A431
500	0.046	0.04
650	0.078	0.039
CA125 DNA 表現 (ΔOD)	0.032	-0.001

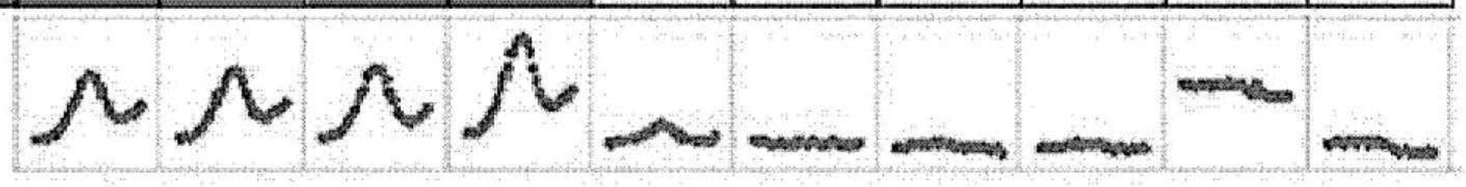


【圖24】

#1

AFP- 陽性　　AFP- 陰性

波長	Huh7	HepG2	Hep3B	PLC	SNU475	SNU387	SNU423	SNU449	SK Hep1	HeLa
500	0.042	0.043	0.043	0.044	0.041	0.042	0.039	0.039	0.061	0.041
650	0.063	0.065	0.066	0.076	0.047	0.041	0.041	0.041	0.06	0.041
AFP mRNA 表現 (CCLE)	12.3	10.8	5.51	2.4	-0.79	-0.69	-1.07	-1.88	-3.7	-1.0
AFP DNA 表現 (△OD)	0.021	0.022	0.023	0.032	0.006	-0.001	0.002	0.002	-0.001	0



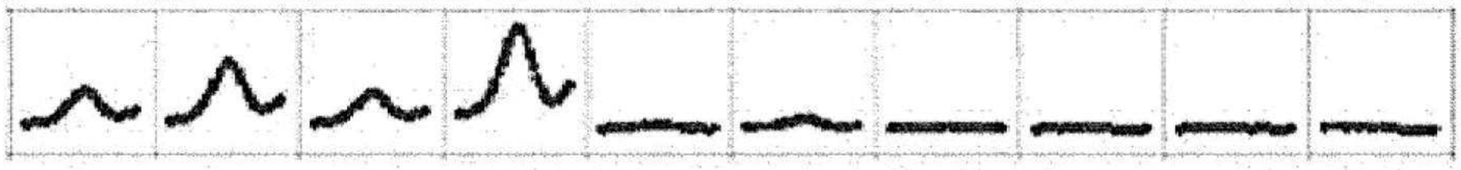
AFP DNA 表現
(△OD)

【圖25】

#2

AFP- 陽性　　AFP- 陰性

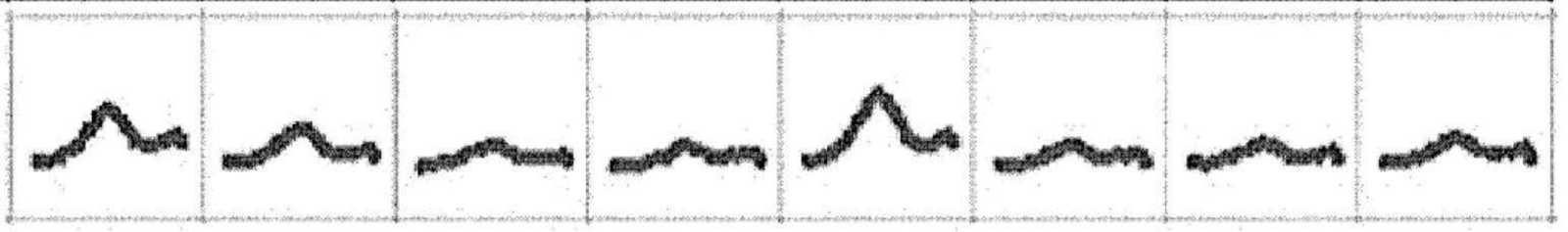
波長	Huh7	HepG2	Hep3B	PLC	SNU475	SNU387	SNU423	SNU449	SK Hep1	HeLa
490	0.043	0.048	0.044	0.054	0.038	0.04	0.04	0.038	0.038	0.04
650	0.08	0.111	0.078	0.149	0.043	0.05	0.041	0.041	0.04	0.041
AFP mRNA 表現 (CCLE)	12.3	10.8	5.51	2.4	-0.79	-0.69	-1.07	-1.88	-3.7	-1.0
AFP DNA 表現 (△OD)	0.037	0.063	0.034	0.095	0.005	0.01	0.001	0.003	0.002	0.001



【圖26】

PC#41 (前列腺癌患者)

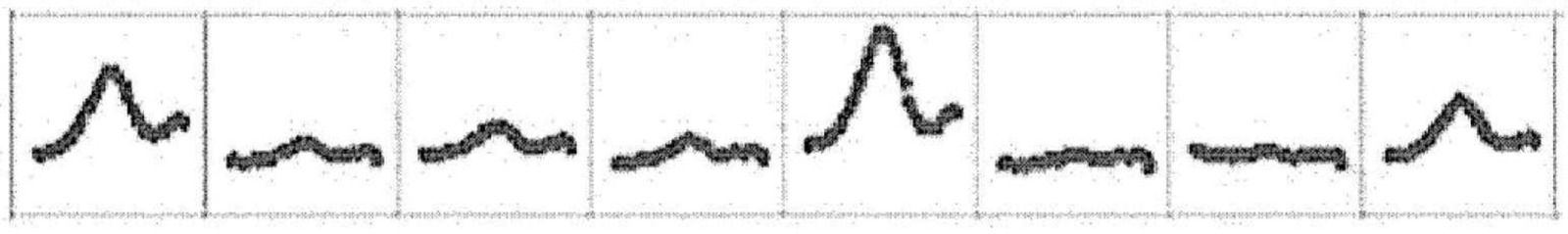
Wav.	PSA, 27	PSA, 95	PSMA, 27	PSMA, 95	PAP, 27	PAP, 95	PAC3, 27	PAC3, 95
500	0.043	0.043	0.04	0.041	0.043	0.041	0.042	0.042
650	0.069	0.06	0.051	0.051	0.076	0.052	0.052	0.055
ctDNA (ΔOD)	0.026	0.017	0.011	0.01	0.033	0.011	0.01	0.013



【圖27】

PC#47 (前列腺癌患者)

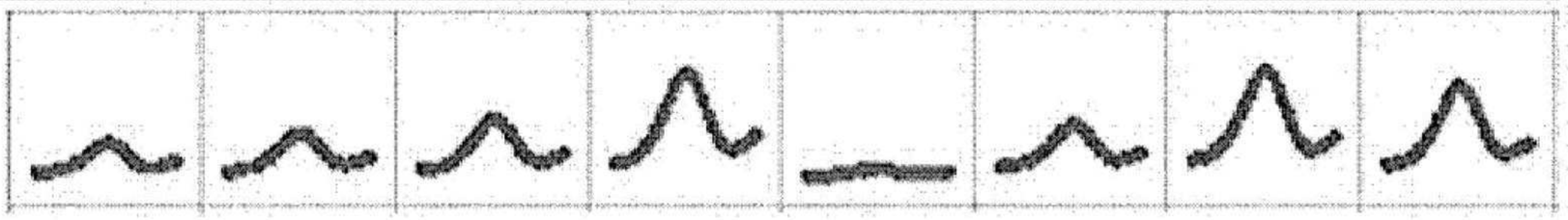
Wav.	PSA, 27	PSA, 95	PSMA, 27	PSMA, 95	PAP, 27	PAP, 95	PAC3, 27	PAC3, 95
500	0.045	0.041	0.045	0.041	0.049	0.04	0.048	0.044
650	0.087	0.051	0.059	0.052	0.108	0.045	0.047	0.072
ctDNA (ΔOD)	0.042	0.01	0.014	0.011	0.059	0.005	-0.001	0.028



【圖28】

PC#44 (前列腺癌患者)

Wav.	PSA, 27	PSA, 95	PSMA, 27	PSMA, 95	PAP, 27	PAP, 95	PAC3, 27	PAC3, 95
500	0.045	0.046	0.048	0.056	0.04	0.051	0.059	0.053
650	0.078	0.09	0.106	0.16	0.049	0.099	0.162	0.144
ctDNA (ΔOD)	0.033	0.044	0.058	0.104	0.009	0.048	0.103	0.091

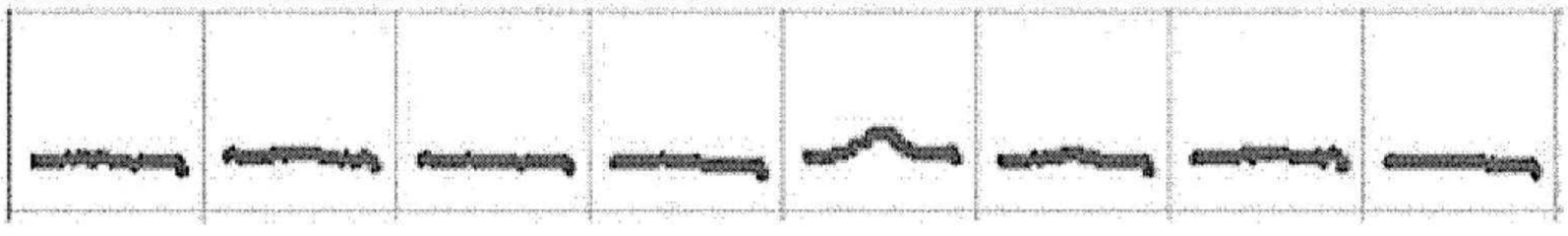


截止>0.015

【圖29】

正常#1

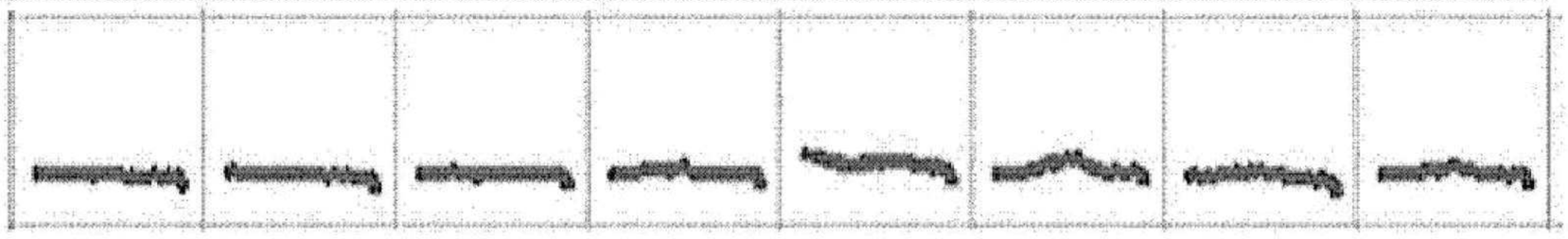
WAV.	PSA, 27	PSA, 95	PSMA, 27	PSMA, 95	PAP, 27	PAP, 95	PAC3, 27	PAC3, 95
500	0.039	0.042	0.04	0.038	0.041	0.04	0.04	0.038
650	0.04	0.043	0.039	0.039	0.054	0.042	0.044	0.04
ctDNA (ΔOD)	0.001	0.001	-0.001	0.001	0.013	0.002	0.004	0.002



【圖30】

正常#2

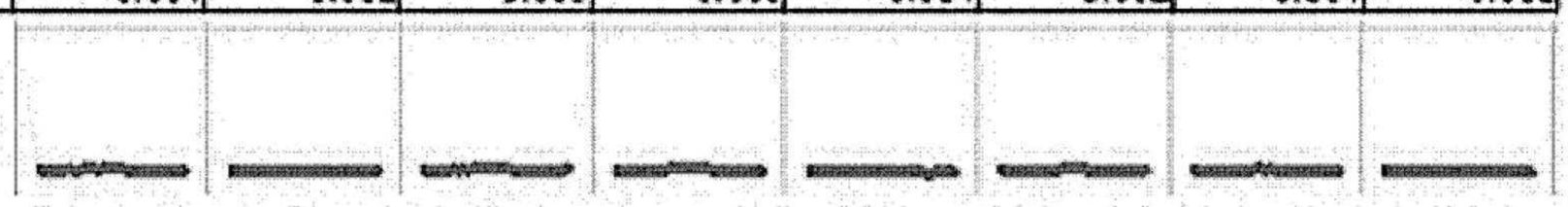
WAV.	PSA, 27	PSA, 95	PSMA, 27	PSMA, 95	PAP, 27	PAP, 95	PAC3, 27	PAC3, 95
500	0.039	0.04	0.039	0.038	0.049	0.039	0.038	0.038
650	0.039	0.04	0.039	0.042	0.045	0.047	0.04	0.042
ctDNA (ΔOD)	0	0	0	0.004	-0.004	0.008	0.002	0.004



【圖31】

正常#3

WAV.	PSA, 27	PSA, 95	PSMA, 27	PSMA, 95	PAP, 27	PAP, 95	PAC3, 27	PAC3, 95
500	0.041	0.039	0.041	0.04	0.039	0.041	0.04	0.039
650	0.042	0.041	0.044	0.045	0.04	0.043	0.041	0.041
ctDNA (ΔOD)	0.001	0.002	0.003	0.005	0.001	0.002	0.001	0.002



截止>0.015

【圖32】

肺癌患者#1

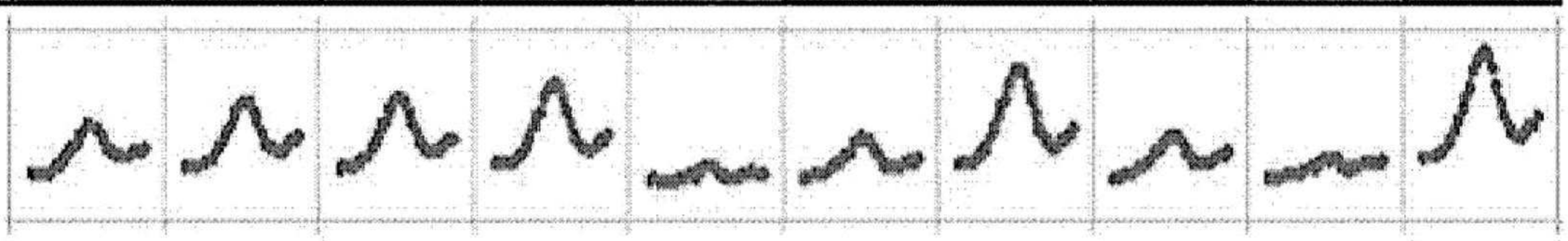
WAV.	NSE, 27	NSE, 95	SCC, 27	SCC, 95	CEA, 27	CEA, 95	Cyfra21-1, 27	Cyfra21-1, 95	TPA, 27	TPA, 95
500	0.041	0.041	0.042	0.041	0.043	0.042	0.045	0.042	0.045	0.045
650	0.053	0.045	0.053	0.051	0.056	0.053	0.074	0.06	0.073	0.074
ctDNA (ΔOD)	0.012	0.004	0.011	0.01	0.013	0.011	0.029	0.018	0.028	0.029



【圖33】

肺癌患者 #2

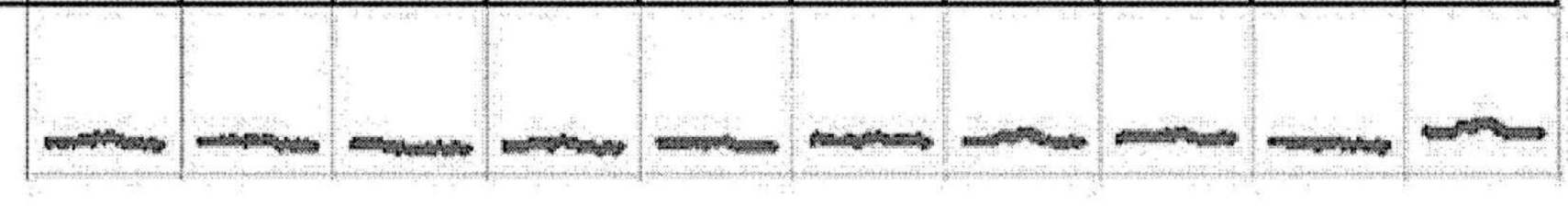
WAV.	NSE, 27	NSE, 95	SCC, 27	SCC, 95	CEA, 27	CEA, 95	Cyfra21-1, 27	Cyfra21-1, 95	TPA, 27	TPA, 95
500	0.043	0.045	0.044	0.046	0.04	0.041	0.046	0.041	0.041	0.048
650	0.06	0.068	0.069	0.074	0.045	0.055	0.08	0.056	0.048	0.086
ctDNA (ΔOD)	0.017	0.023	0.025	0.028	0.005	0.014	0.034	0.015	0.007	0.038



【圖34】

正常

WAV.	NSE, 27	NSE, 95	SCC, 27	SCC, 95	CEA, 27	CEA, 95	Cyfra21-1, 27	Cyfra21-1, 95	TPA, 27	TPA, 95
500	0.039	0.039	0.038	0.037	0.039	0.04	0.039	0.04	0.039	0.043
650	0.04	0.04	0.036	0.04	0.039	0.041	0.042	0.042	0.039	0.047
ctDNA (ΔOD)	0.001	0.001	-0.002	0.003	0	0.001	0.003	0.002	0	0.004



截止 >0.01

【圖35】

甲狀腺癌患者#1

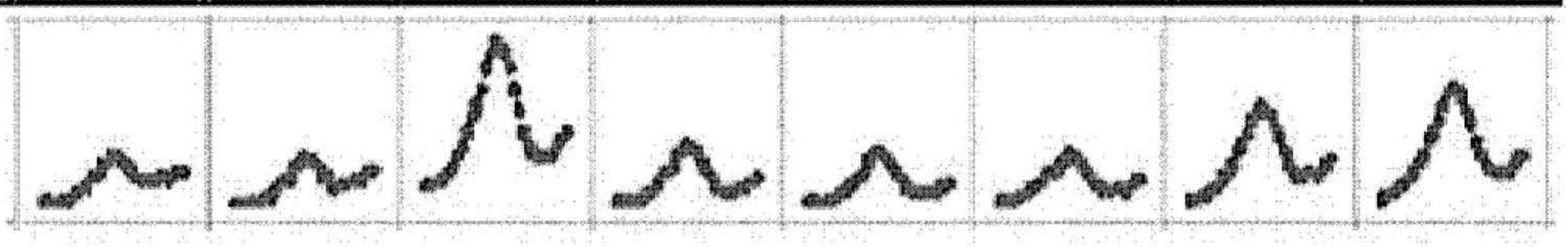
WAV.	CEA, 27	CEA, 95	NSE, 27	NSE, 95	TG, 27	TG, 95	CALCA, 27	CALCA, 95
500	0.04	0.04	0.045	0.057	0.041	0.051	0.04	0.04
650	0.046	0.045	0.09	0.177	0.055	0.109	0.056	0.053
ctDNA (ΔOD)	0.006	0.005	0.045	0.12	0.014	0.058	0.016	0.013



【圖36】

甲狀腺癌患者#2

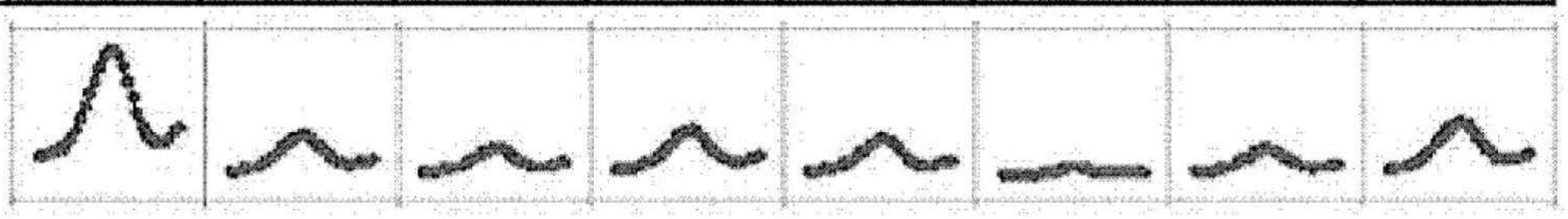
WAV.	CEA, 27	CEA, 95	NSE, 27	NSE, 95	TG, 27	TG, 95	CALCA, 27	CALCA, 95
500	0.041	0.041	0.046	0.042	0.041	0.04	0.042	0.043
650	0.054	0.054	0.084	0.056	0.053	0.054	0.067	0.073
ctDNA (ΔOD)	0.013	0.013	0.038	0.014	0.012	0.014	0.025	0.03



【圖37】

甲狀腺癌

WAV.	CEA, 27	CEA, 95	NSE, 27	NSE, 95	TG, 27	TG, 95	CALCA, 27	CALCA, 95
500	0.065	0.046	0.045	0.047	0.045	0.04	0.045	0.047
650	0.204	0.093	0.075	0.099	0.087	0.05	0.075	0.11
ctDNA (ΔOD)	0.139	0.047	0.03	0.052	0.042	0.01	0.03	0.063

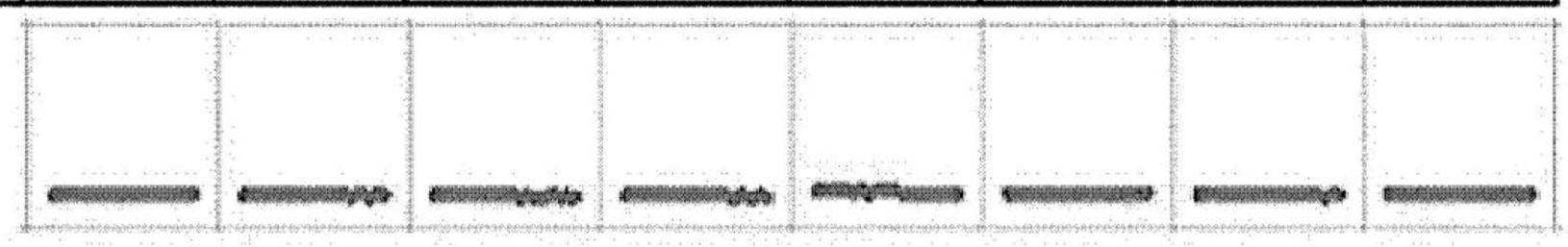


截止 >0.01

【圖38】

正常#1

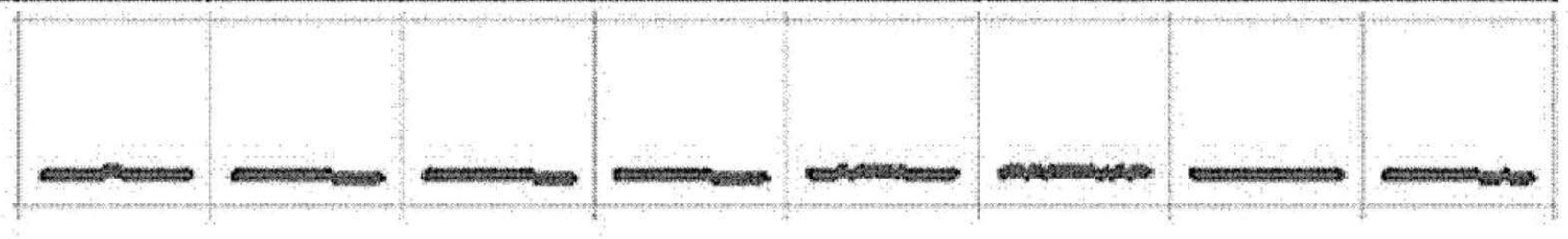
WAV.	CEA, 27	CEA, 95	NSE, 27	NSE, 95	TG, 27	TG, 95	CALCA, 27	CALCA, 95
500	0.038	0.039	0.039	0.038	0.041	0.04	0.039	0.039
650	0.04	0.04	0.038	0.041	0.041	0.04	0.04	0.041
ctDNA (ΔOD)	0.002	0.001	-0.001	0.003	0	0	0.001	0.002



【圖39】

正常#2

WAV.	CEA, 27	CEA, 95	NSE, 27	NSE, 95	TG, 27	TG, 95	CALCA, 27	CALCA, 95
500	0.038	0.038	0.039	0.039	0.041	0.041	0.04	0.039
650	0.042	0.039	0.04	0.039	0.043	0.043	0.041	0.04
ctDNA (ΔOD)	0.004	0.001	0.001	0	0.002	0.002	0.001	0.001

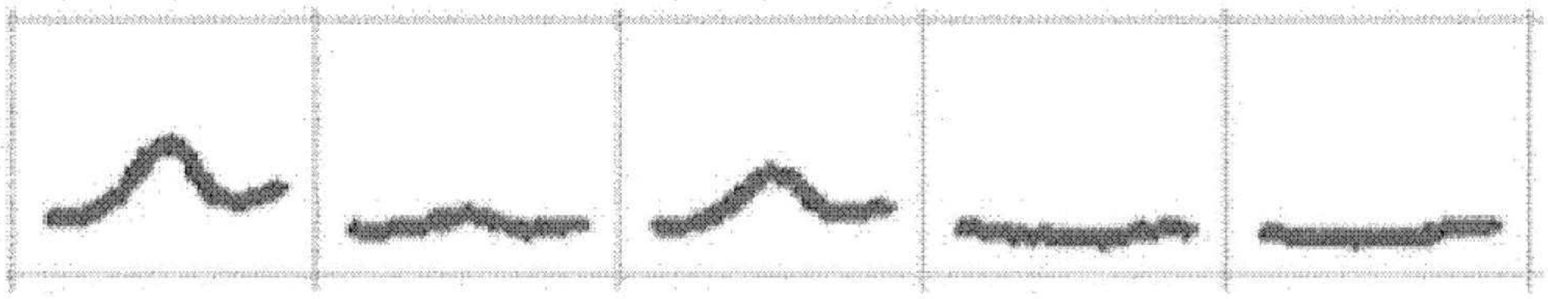


截止>0.01

【圖40】

膀胱癌患者#1

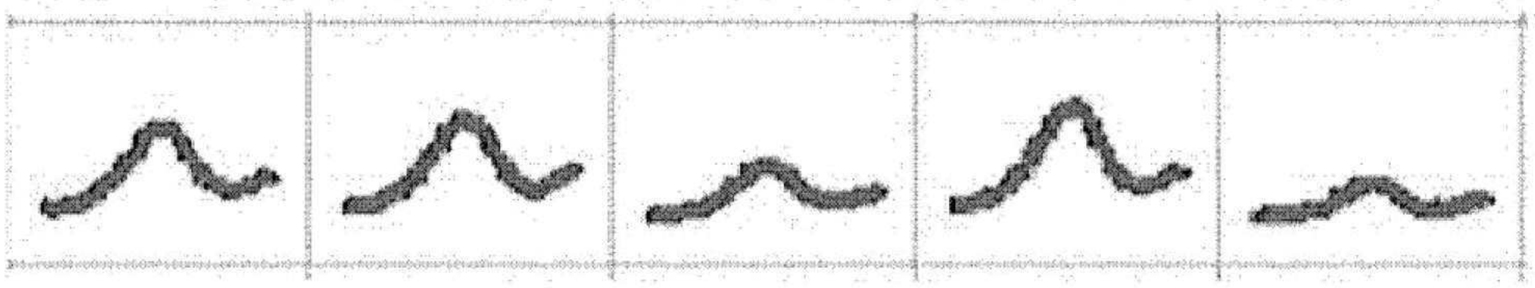
WAV.	OGT	FGFR3	TP53	NMP22	Cyfra21-1
500	0.044	0.041	0.041	0.041	0.039
650	0.071	0.046	0.061	0.037	0.037
ctDNA (ΔOD)	0.027	0.005	0.02	-0.004	-0.002



【圖41】

膀胱癌患者

WAV.	OGT	FGFR3	TP53	NMP22	Cyfra21-1
500	0.046	0.047	0.043	0.047	0.043
650	0.076	0.079	0.061	0.083	0.055
ctDNA (ΔOD)	0.03	0.032	0.018	0.036	0.012

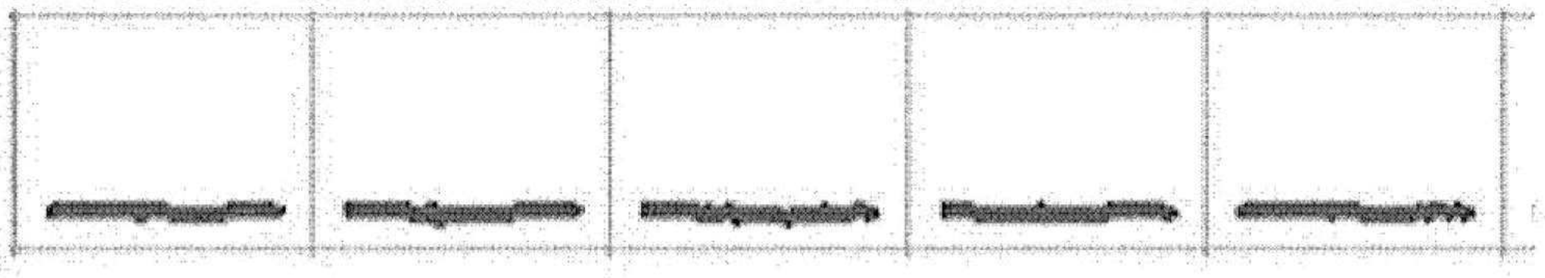


截止 >0.01

【圖42】

膀胱炎患者#1 (血尿)

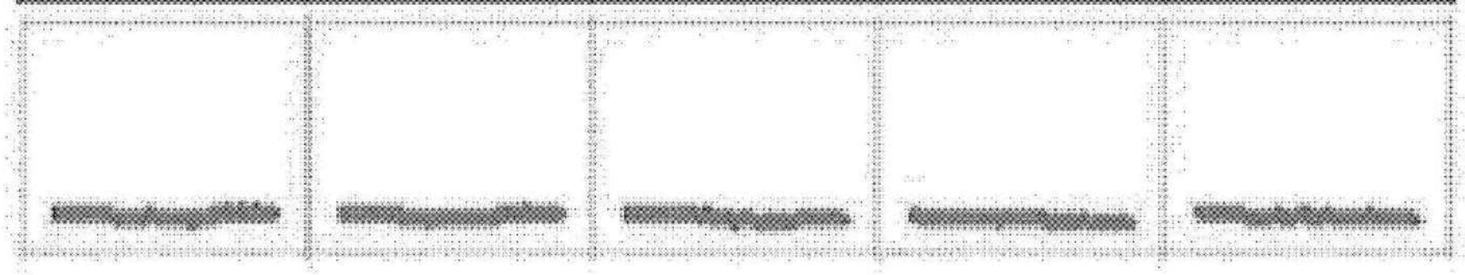
WAV.	OGT	FGFR3	TP53	NMP22	Cyfra21-1
500	0.039	0.04	0.039	0.04	0.039
650	0.039	0.038	0.037	0.038	0.039
ctDNA (ΔOD)	0	-0.002	-0.002	-0.002	0



【圖43】

膀胱炎患者#2 (血尿)

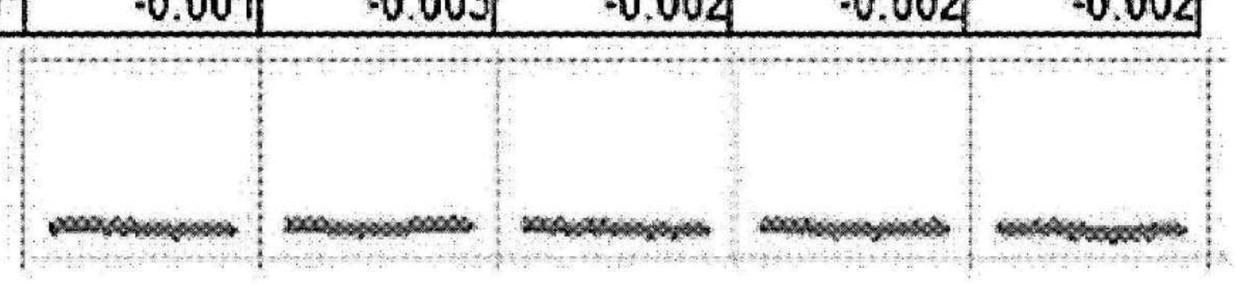
OGT	FGFR3	TP53	NMP22	Cyfra21-1
0.04	0.04	0.039	0.039	0.04
0.038	0.038	0.037	0.037	0.039
-0.002	-0.002	-0.002	-0.002	-0.001



【圖44】

正常#1

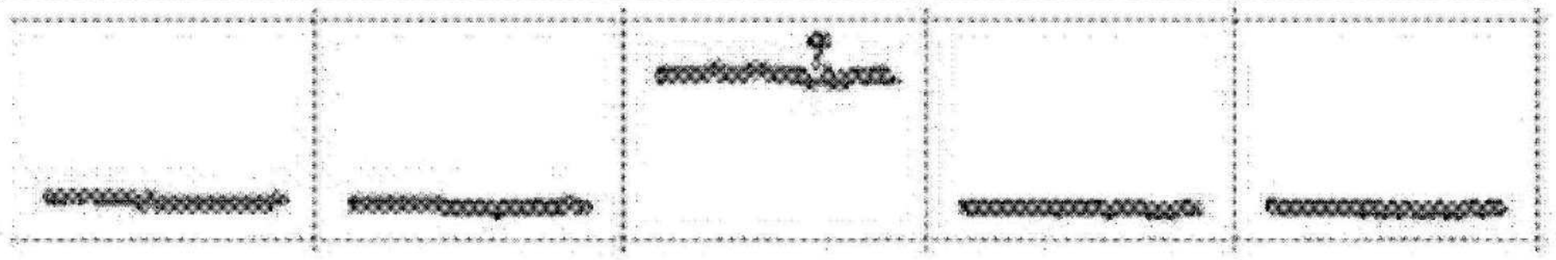
WAV.	OGT	FGFR3	TP53	NMP22	Cyfra21-1
500	0.039	0.04	0.04	0.039	0.038
650	0.038	0.037	0.038	0.037	0.036
ctDNA (ΔOD)	-0.001	-0.003	-0.002	-0.002	-0.002



【圖45】

正常#2

OGT	FGFR3	TP53	NMP22	Cyfra21-1
0.042	0.04	0.092	0.038	0.039
0.04	0.037	0.094	0.037	0.037
-0.002	-0.003	0.002	-0.001	-0.002

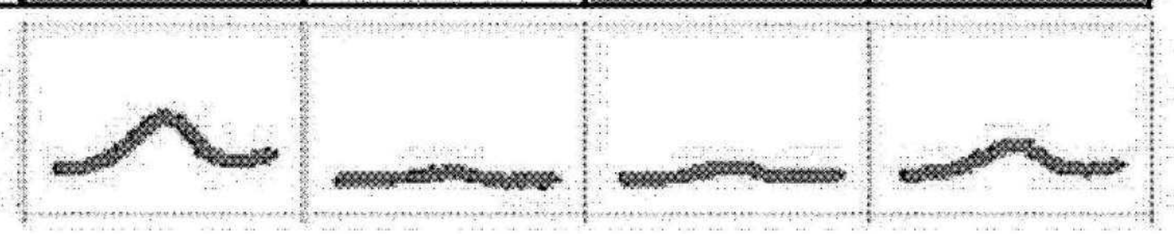


截止 >0.01

【圖46】

乳癌患者#1

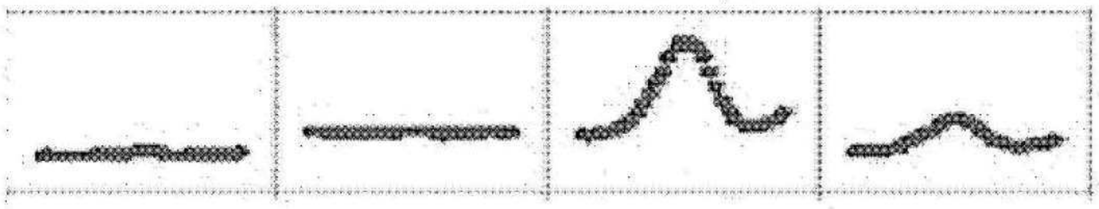
WAV.	CA27-29 (CA15-3), 27	CA27-29 (CA15-3), 95	CEA, 27	CEA, 95
500	0.049	0.039	0.041	0.044
650	0.092	0.045	0.051	0.069
ctDNA (ΔOD)	0.043	0.006	0.01	0.025



【圖47】

乳癌患者#2

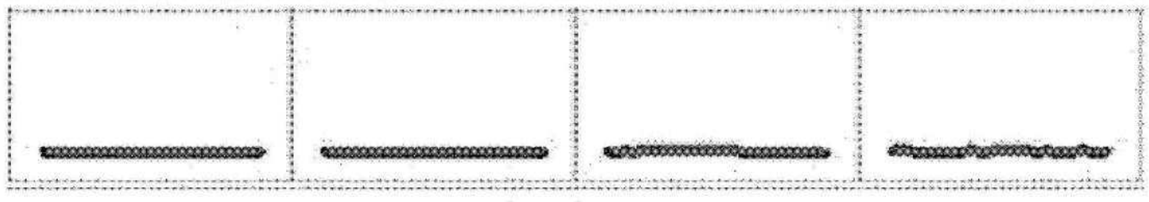
WAV.	CA27-29 (CA15-3), 27	CA27-29 (CA15-3), 95	CEA, 27	CEA, 95
500	0.042	0.064	0.061	0.045
650	0.045	0.064	0.143	0.074
ctDNA (ΔOD)	0.003	0	0.082	0.029



【圖48】

正常#1

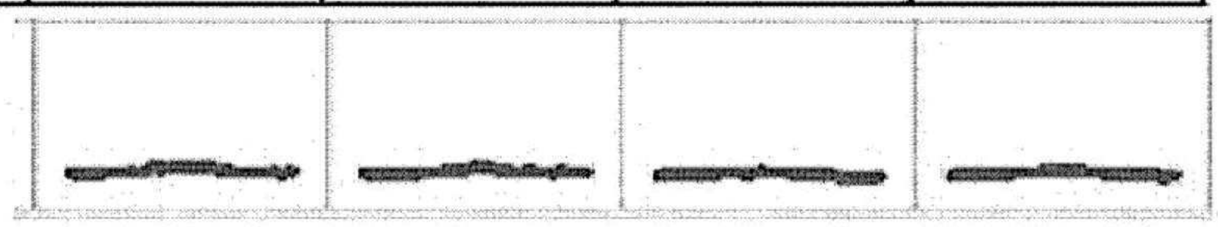
WAV.	CA27-29 (CA15-3), 27	CA27-29 (CA15-3), 95	CEA, 27	CEA, 95
500	0.037	0.038	0.038	0.039
650	0.037	0.038	0.04	0.04
ctDNA (ΔOD)	0	0	0.002	0.001



【圖49】

正常#2

WAV.	CA27-29 (CA15-3), 27	CA27-29 (CA15-3), 95	CEA, 27	CEA, 95
500	0.04	0.041	0.039	0.039
650	0.048	0.044	0.041	0.044
ctDNA (ΔOD)	0.008	0.003	0.002	0.005

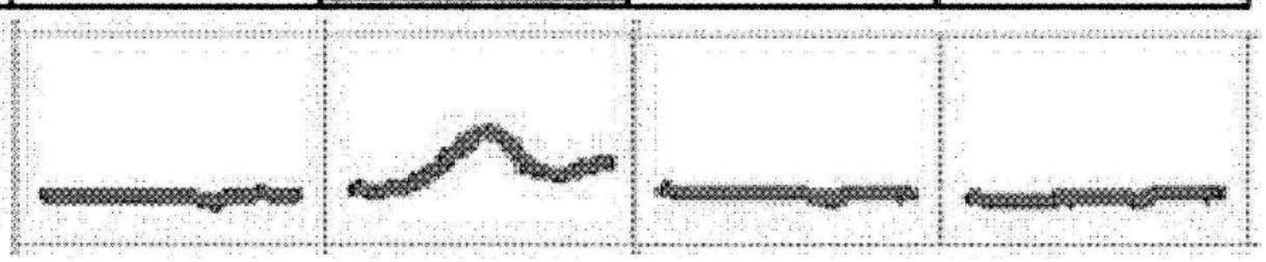


截止 >0.01

【圖50】

大腸直腸癌患者#1

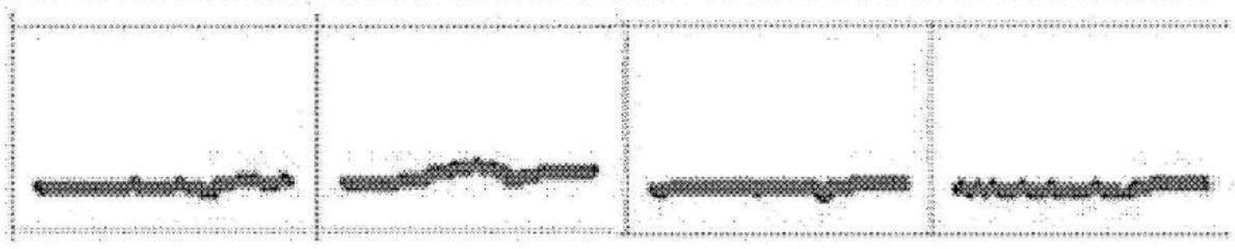
WAV.	CEA, 27	CEA, 95	CA19-9, 27	CA19-9, 95
500	0.043	0.047	0.046	0.041
650	0.042	0.084	0.044	0.041
	-0.001	0.037	-0.002	0



【圖51】

大腸直腸癌患者#2

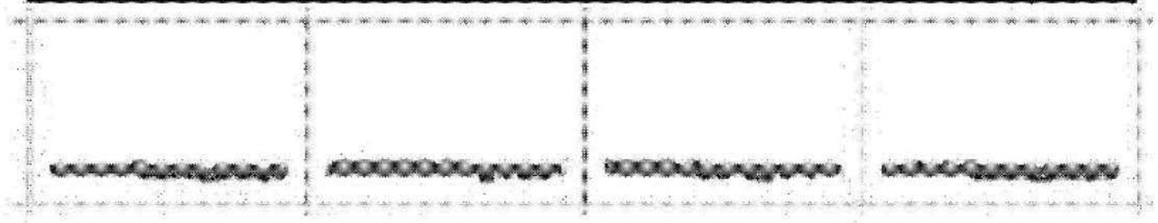
WAV.	CEA, 27	CEA, 95	CA19-9, 27	CA19-9, 95
500	0.04	0.043	0.041	0.041
650	0.04	0.054	0.041	0.04
	0	0.011	0	-0.001



【圖52】

正常#1

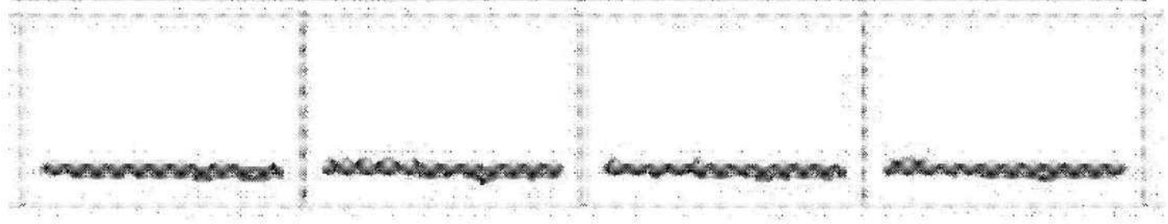
CEA, 27	CEA, 95	CA19-9, 27	CA19-9, 95
0.038	0.039	0.039	0.038
0.037	0.039	0.038	0.037
-0.001	0	-0.001	-0.001



【圖53】

正常#2

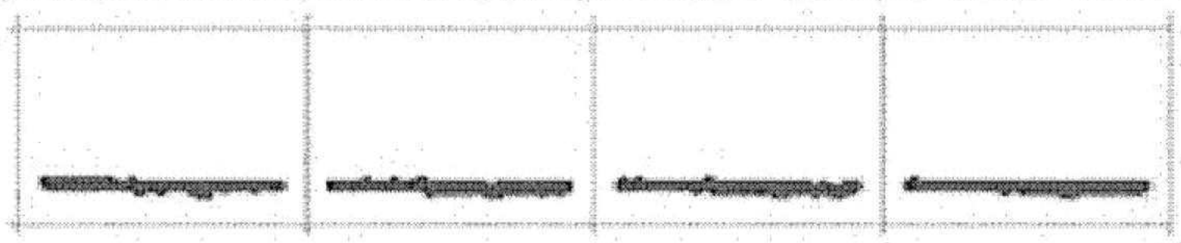
CEA, 27	CEA, 95	CA19-9, 27	CA19-9, 95
0.04	0.038	0.039	0.038
0.037	0.037	0.037	0.037
-0.003	-0.001	-0.002	-0.001



【圖54】

正常#3

CEA, 27	CEA, 95	CA19-9, 27	CA19-9, 95
0.039	0.039	0.039	0.039
0.037	0.037	0.037	0.037
-0.002	-0.002	-0.002	-0.002

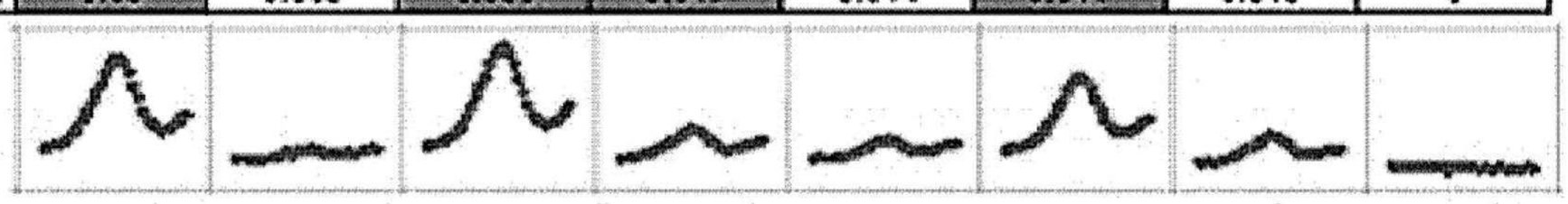


截止>0.01

【圖55】

膽道癌患者

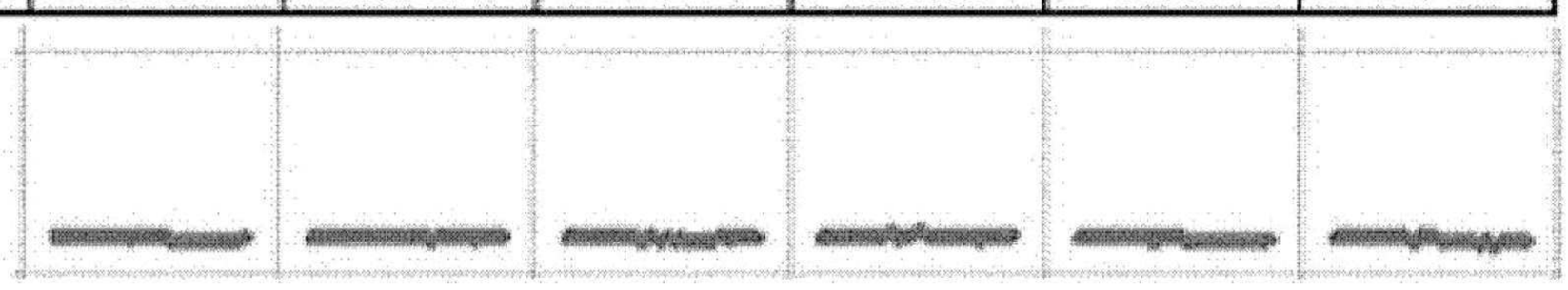
WAV.	CA19-9, 27	CA19-9, 95	CA125, 27	CA125, 95	CEA, 27	CEA, 95	PC	NC
500	0.049	0.042	0.049	0.042	0.042	0.047	0.04	0.038
650	0.099	0.047	0.105	0.059	0.053	0.088	0.055	0.038
ctDNA (ΔOD)	0.05	0.005	0.056	0.017	0.011	0.041	0.015	0



【圖56】

正常#1

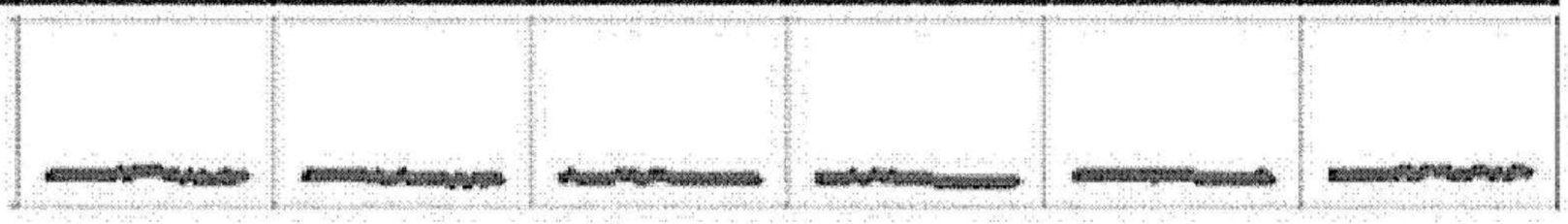
WAV.	CA19-9, 27	CA19-9, 95	CA125, 27	CA125, 95	CEA, 27	CEA, 95
500	0.04	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039
650	0.039	0.04	0.039	0.041	0.04	0.039
ctDNA (ΔOD)	-0.001	0.001	0	0.002	0.001	0



【圖57】

正常#2

WAV.	CA19-9, 27	CA19-9, 95	CA125, 27	CA125, 95	CEA, 27	CEA, 95
500	0.039	0.039	0.039	0.037	0.039	0.04
650	0.042	0.039	0.039	0.038	0.04	0.042
ctDNA (ΔOD)	0.003	0	0	0.001	0.001	0.002



截止>0.01

【圖58】

胃癌患者

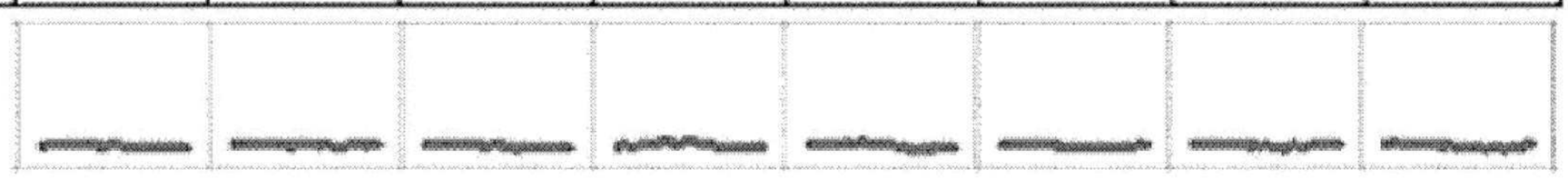
WAV.	CEA, 27	CEA, 95	CA19-9, 27	CA19-9, 95	CGB, 27	CGB, 95	Cyfra21-1, 27	Cyfra21-1, 27
500	0.042	0.046	0.049	0.041	0.047	0.042	0.048	0.044
650	0.059	0.082	0.103	0.051	0.102	0.052	0.084	0.074
ctDNA (ΔOD)	0.017	0.036	0.054	0.01	0.055	0.01	0.036	0.03



【圖59】

正常#1

WAV.	CEA, 27	CEA, 95	CA19-9, 27	CA19-9, 95	CGB, 27	CGB, 95	Cyfra21-1, 27	Cyfra21-1, 95
500	0.038	0.04	0.039	0.038	0.039	0.039	0.04	0.04
650	0.039	0.04	0.039	0.041	0.04	0.038	0.039	0.039
ctDNA (ΔOD)	0.001	0	0	0.003	0.001	-0.001	-0.001	-0.001



【圖60】

正常#2

WAV.	CEA, 27	CEA, 95	CA19-9, 27	CA19-9, 95	CGB, 27	CGB, 95	Cyfra21-1, 27	Cyfra21-1, 27
500	0.04	0.04	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039
650	0.04	0.041	0.042	0.04	0.038	0.038	0.038	0.038
ctDNA (ΔOD)	0	0.031	0.003	0.001	-0.001	-0.001	-0.001	-0.001

截止 >0.01

【圖61】

胰臟癌患者#1

WAV.	CEA	CEA	CA19-9	CA19-9	CA125	CA125
500	0.042	0.046	0.047	0.043	0.04	0.039
650	0.046	0.052	0.089	0.068	0.041	0.039
	0.004	0.006	0.042	0.025	0.001	0
Int.	0.16	0.24	1.68	1	0.04	0

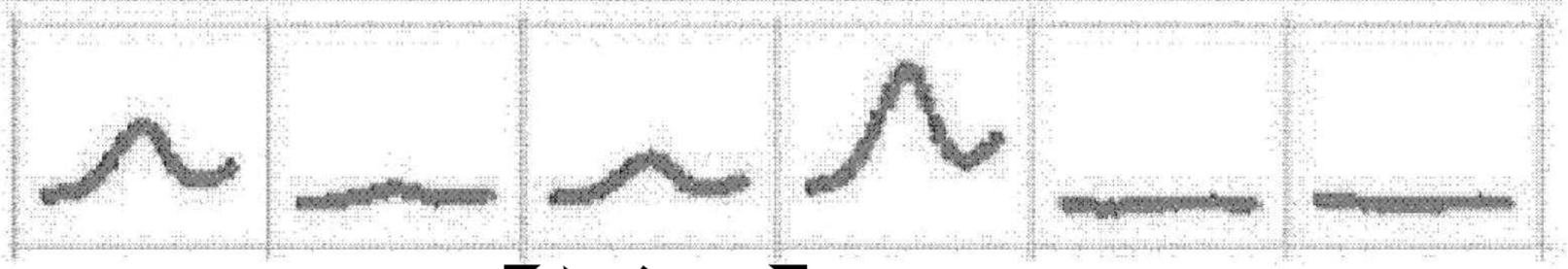
【圖62】

胰臟癌患者#2

WAV.	CEA	CEA	CA19-9	CA19-9	CA125	CA125
500	0.046	0.044	0.046	0.05	0.039	0.042
650	0.072	0.067	0.084	0.088	0.038	0.04
	0.026	0.023	0.038	0.038	-0.001	-0.002
Int.	0.79	0.70	1.15	1.15	-0.03	-0.06

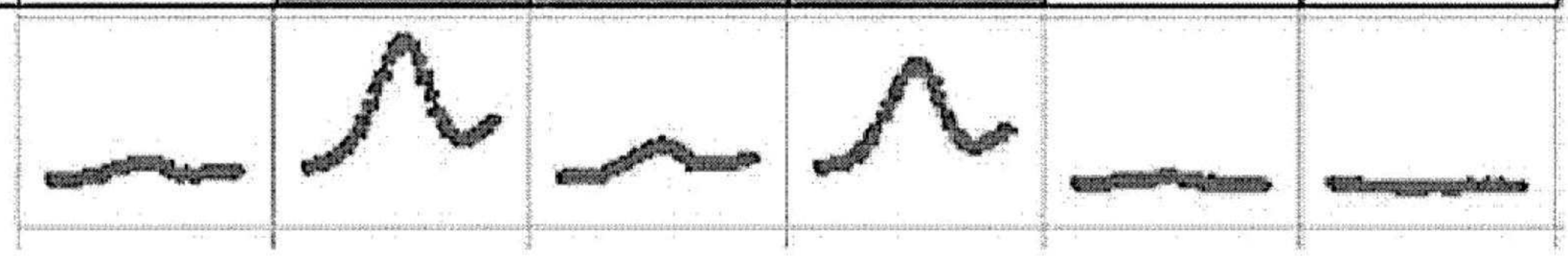
【圖63】

胰臟癌患者#3

WAV.	CEA	CEA	CA19-9	CA19-9	CA125	CA125
500	0.046	0.04	0.044	0.053	0.039	0.043
650	0.097	0.051	0.073	0.137	0.04	0.039
	0.051	0.011	0.029	0.084	0.001	-0.004
Int.	1.55	0.33	0.88	2.55	0.03	-0.12
						

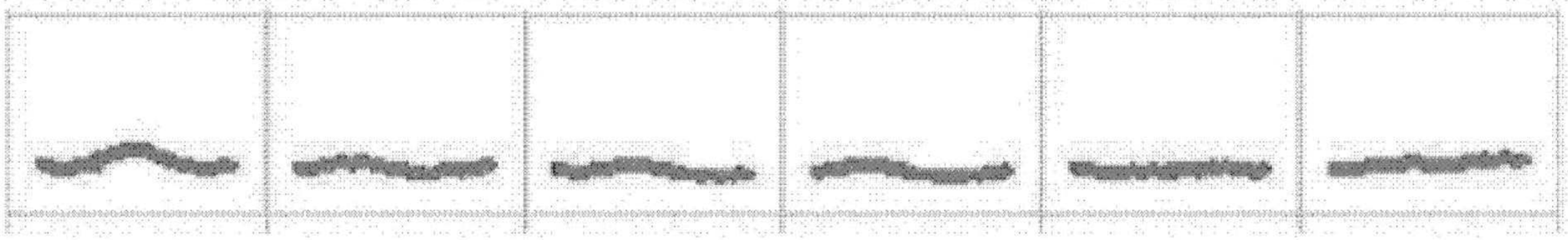
【圖64】

胰臟癌患者#4

WAV.	CEA	CEA	CA19-9	CA19-9	CA125	CA125
500	0.042	0.051	0.044	0.05	0.04	0.039
650	0.054	0.134	0.064	0.117	0.044	0.037
	0.012	0.083	0.02	0.067	0.004	-0.002
Int.	0.46	3.19	0.77	2.58	0.15	-0.08
						

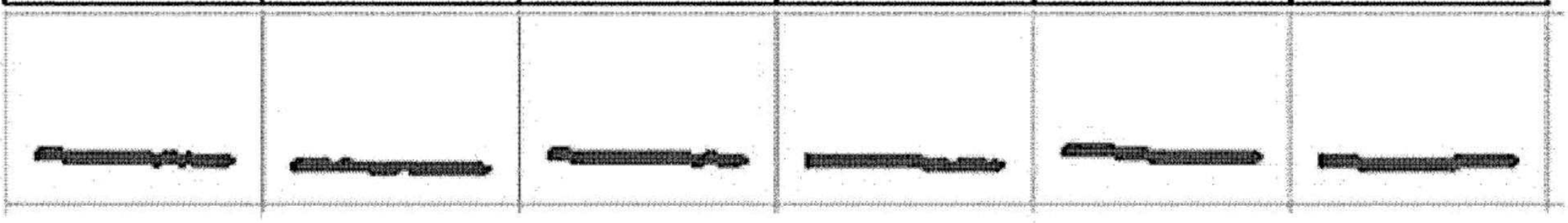
【圖65】

正常#1

BC(Nor), CEA	BC(Nor), CEA	BC(Nor) CA19-9	BC(Nor) CA19-9	BC(Nor), CA125	BC(Nor), CA125
0.043	0.041	0.041	0.04	0.042	0.041
0.048	0.042	0.041	0.039	0.041	0.043
0.005	0.001	0	-0.001	-0.001	0.002
0.2	0.04	0	-0.04	-0.04	0.08
					

【圖66】

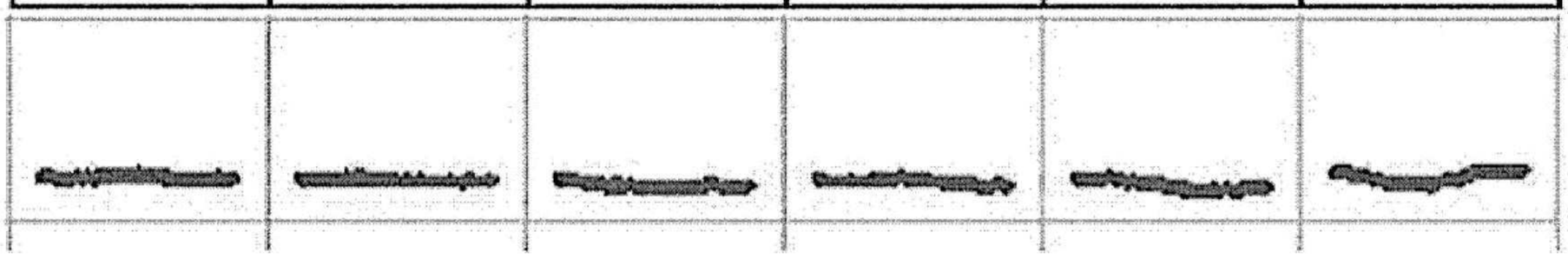
正常#2

BC(Nor), CEA	BC(Nor), CEA	BC(Nor) CA19-9	BC(Nor) CA19-9	BC(Nor), CA125	BC(Nor), CA125
0.046	0.039	0.047	0.042	0.049	0.042
0.044	0.037	0.045	0.041	0.045	0.039
-0.002	-0.002	-0.002	-0.001	-0.004	-0.003
-0.08	-0.08	-0.08	-0.04	-0.15	-0.12
					

【圖67】

正常#3

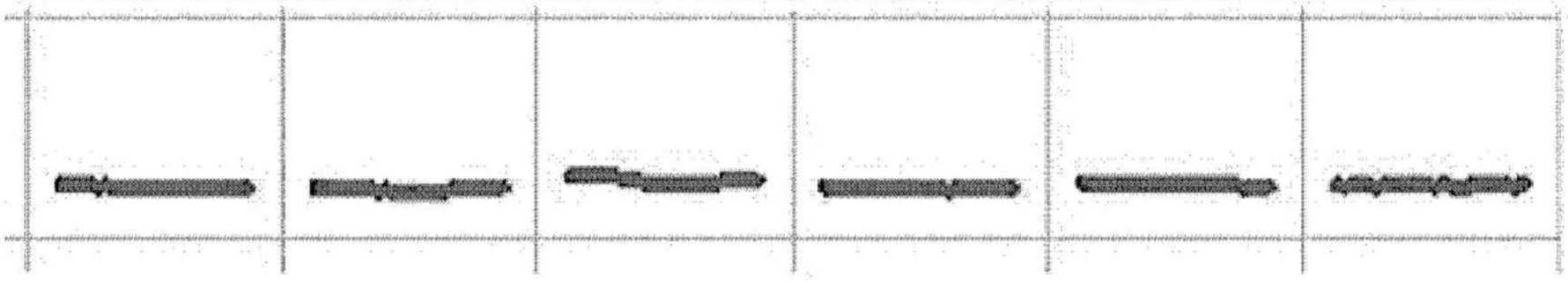
Nor(Cho), CEA	Nor(Cho), CEA	Nor(Cho) CA19-9	Nor(Cho) CA19-9	Nor(Cho), CA125	Nor(Cho), CA125
0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.042
0.042	0.04	0.037	0.04	0.037	0.038
0.002	0	-0.003	0	-0.003	-0.004
0.08	0	-0.12	0	-0.12	-0.16



【圖68】

正常#4

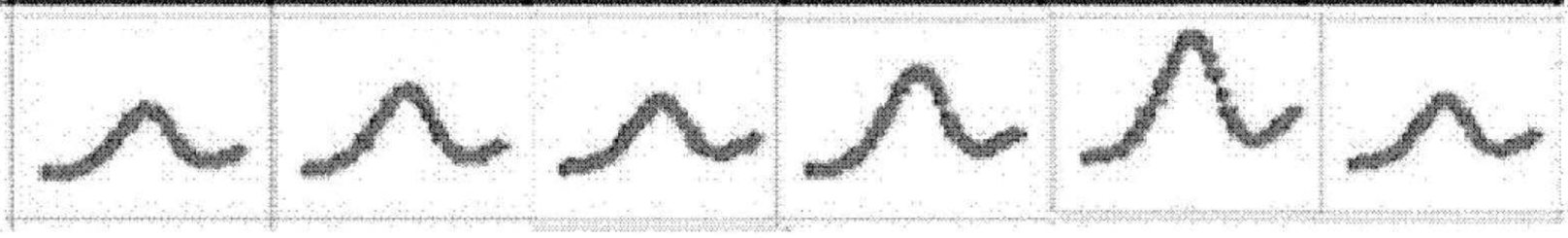
Nor(Cho) CEA	Nor(Cho) CEA	Nor(Cho) CA19-9	Nor(Cho) CA19-9	Nor(Cho) CA125	Nor(Cho) CA125
0.044	0.042	0.049	0.043	0.046	0.043
0.042	0.039	0.045	0.042	0.045	0.044
-0.002	-0.003	-0.004	-0.001	-0.001	0.001
-0.08	-0.12	-0.15	-0.04	-0.04	0.04



【圖69】

來自肺癌患者的血液樣本

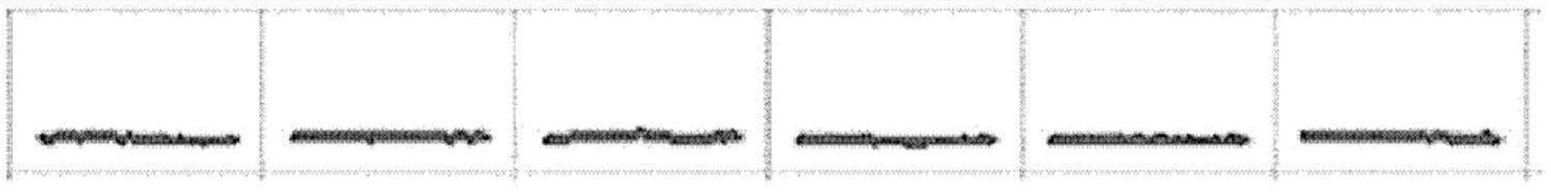
波長	患者 #1, 27	患者 #1, 95	患者 #2, 27	患者 #2, 95	患者 #3, 27	患者 #3, 95
500	0.051	0.056	0.049	0.053	0.056	0.045
650	0.115	0.135	0.099	0.117	0.135	0.071
ctDNA (ΔOD)	0.064	0.079	0.05	0.064	0.079	0.026



【圖70】

來自正常人的血液樣本

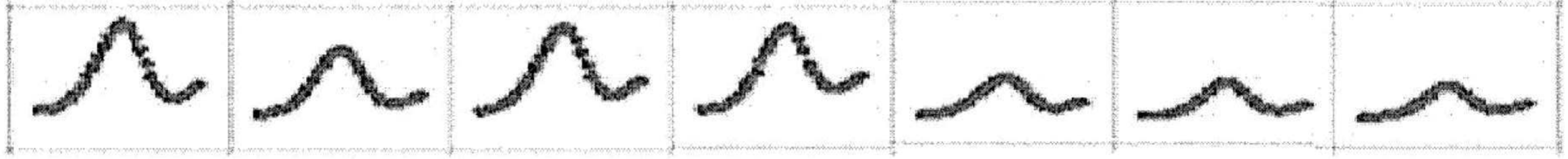
波長	正常 #1, 27	正常 #1, 95	正常 #2, 27	正常 #2, 95	正常 #3, 27	正常 #3, 95
500	0.039	0.042	0.042	0.039	0.04	0.04
650	0.039	0.043	0.039	0.041	0.038	0.04
ctDNA (ΔOD)	0	0.001	-0.003	0.002	-0.002	0



截止 >0.01

【圖71】

來自膀胱癌患者的尿液樣本

波長	患者 #1	患者 #2	患者 #3	患者 #4	患者 #5	肺癌患者#3	肺癌患者#3
500	0.053	0.049	0.049	0.053	0.049	0.051	0.049
650	0.15	0.123	0.12	0.147	0.102	0.11	0.101
ctDNA (ΔOD)	0.097	0.074	0.071	0.094	0.053	0.059	0.052
							

【圖72】

來自正常個體的尿液樣本

波長	正常 #1	正常 #2	正常 #3	正常 #4	正常 #5	正常 #6
500	0.04	0.04	0.04	0.041	0.042	0.042
650	0.041	0.044	0.041	0.042	0.042	0.04
ctDNA (ΔOD)	0.001	0.004	0.001	0.001	0	-0.002

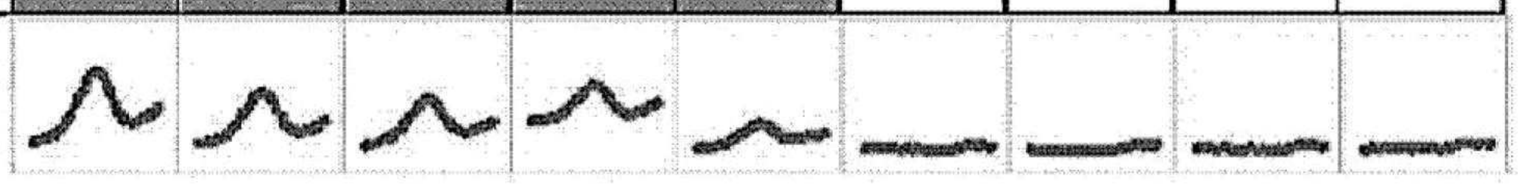
截止 >0.01

【圖73】

PD-L1 表現　　PD-L1 低度表現

PD-L1

結果	MDA-MB-231	HCC827	H1975	PC9	H460	A549	MDA-MB-468	HeLa	MCF7
500	0.044	0.043	0.042	0.059	0.04	0.04	0.04	0.04	0.039
650	0.091	0.076	0.073	0.083	0.057	0.039	0.039	0.039	0.04
OD	0.047	0.033	0.031	0.024	0.017	-0.001	-0.001	-0.001	0.001
Int.	1.679	1.179	1.107	0.857	0.607	-0.036	-0.036	-0.036	0.036
mRNA (CCLE)	3.47	3.42	2.1	1.1	0.9	0.74	-0.39	-1.27	-4.06



【圖74】

干擾素 -γ (IFNG)

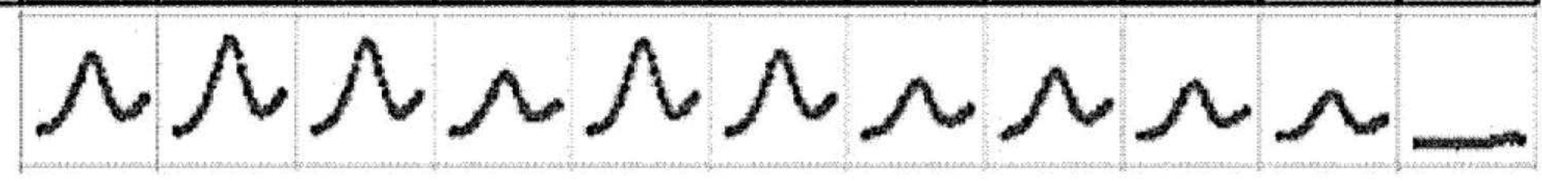
結果	MDA-MB-231	HCC827	H1975	PC9	H460	A549	MDA-MB-468	HeLa	MCF7
500	0.04	0.04	0.039	0.038	0.039	0.04	0.04	0.04	0.04
650	0.038	0.038	0.039	0.038	0.038	0.039	0.039	0.038	0.041
OD	-0.002	-0.002	0	0	-0.001	-0.001	-0.001	-0.002	0.001
Int.	-0.071	-0.071	0.000	0.000	-0.036	-0.036	-0.036	-0.071	0.036



【圖75】

干擾素 -γ 受體1 (IFNGR1)

結果	MDA-MB-231	HCC827	H1975	PC9	H460	A549	MDA-MB-468	HeLa	MCF7	PC	NC
500	0.047	0.047	0.047	0.046	0.048	0.046	0.044	0.044	0.044	0.043	0.038
650	0.098	0.109	0.107	0.085	0.107	0.1	0.08	0.087	0.078	0.071	0.039
OD	0.051	0.062	0.06	0.039	0.059	0.054	0.036	0.043	0.034	0.028	0.001
Int.	1.821	2.214	2.143	1.393	2.107	1.929	1.286	1.536	1.214	1.000	0.036

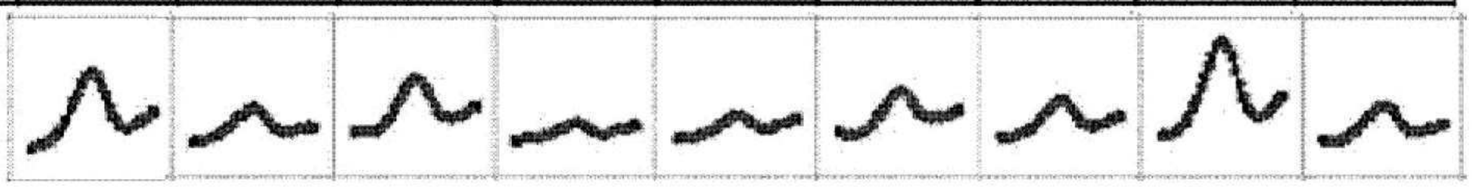


【圖76】

PD-L1

PD-L1 表現　　PD-L1 低度/無表現

結果	MDA-MB-231	HCC827	H1975	PC9	H460	A549	MDA-MB-468	HeLa	MCF7
OD	0.04	0.02	0.03	0.01	0.013	0.023	0.021	0.053	0.02
Int.	1.72	1.33	2.00	0.67	0.87	1.53	1.40	3.53	1.33



【圖77】

干擾素 -γ (IFNG)

結果	MDA-MB-231	HCC827	H1975	PC9	H460	A549	MDA-MB-468	HeLa	MCF7
OD	0.00	-0.001	0	-0.001	-0.001	-0.002	-0.002	-0.003	-0.003
Int.	0.08	-0.07	0.00	-0.07	-0.07	-0.13	-0.13	-0.20	-0.20

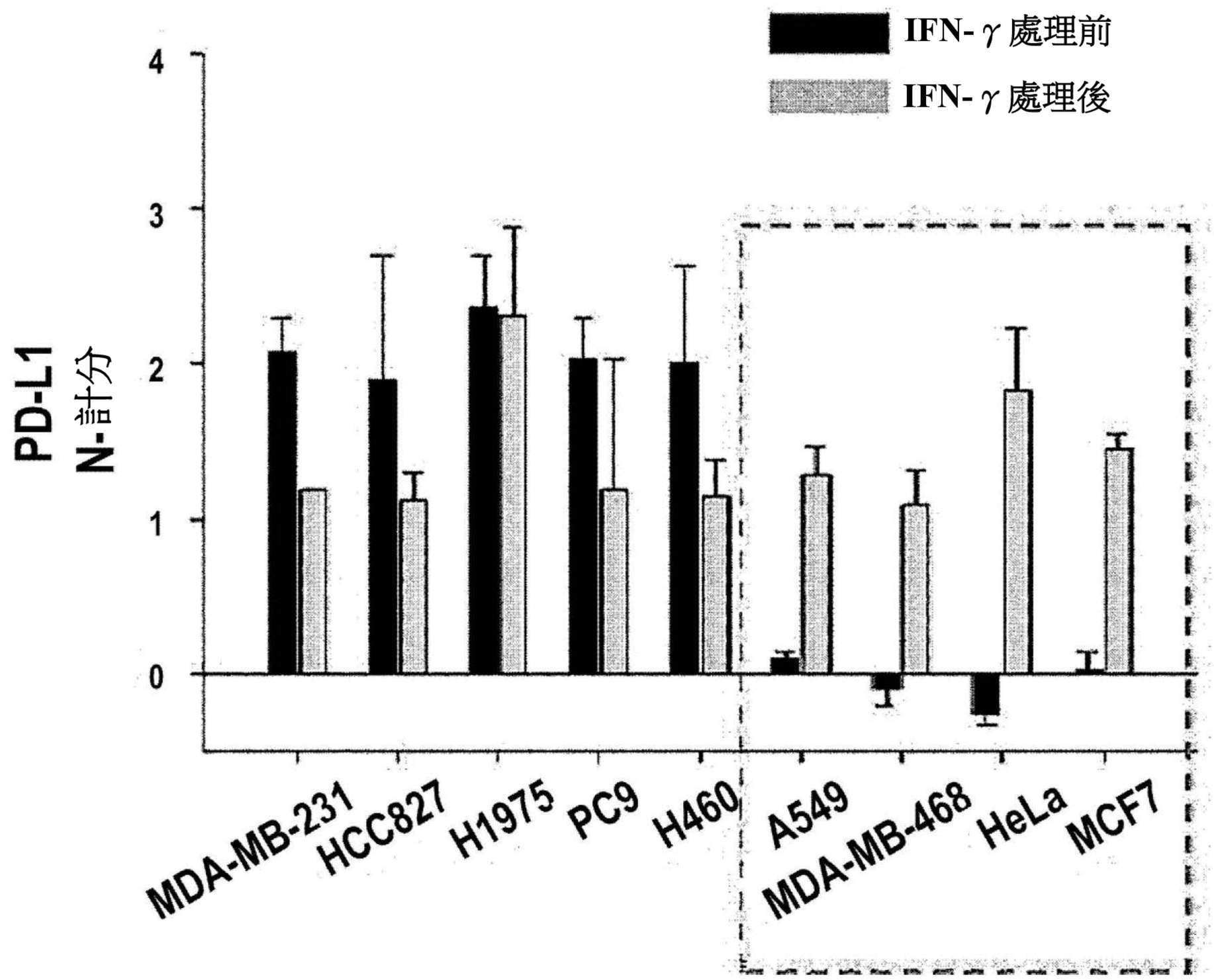


【圖78】

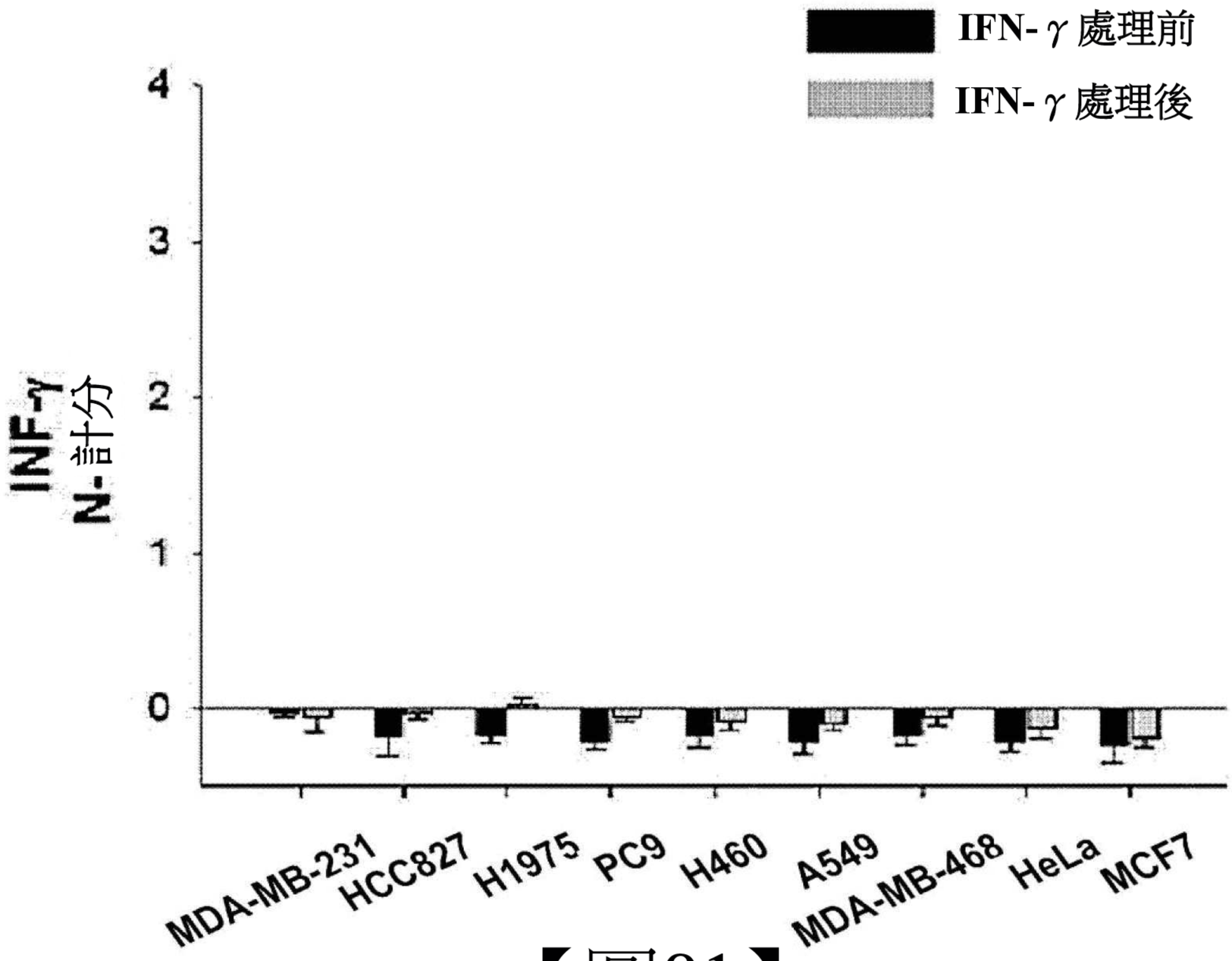
干擾素 -γ 受體1 (IFNGR1)

結果	MDA-MB-231	HCC827	H1975	PC9	H460	A549	MDA-MB-468	HeLa	MCF7
OD	0.04	0.017	0.014	0.017	0.023	0.011	0.011	0.019	0.008
Int.	1.83	1.13	0.93	1.13	1.53	0.73	0.73	1.27	0.53

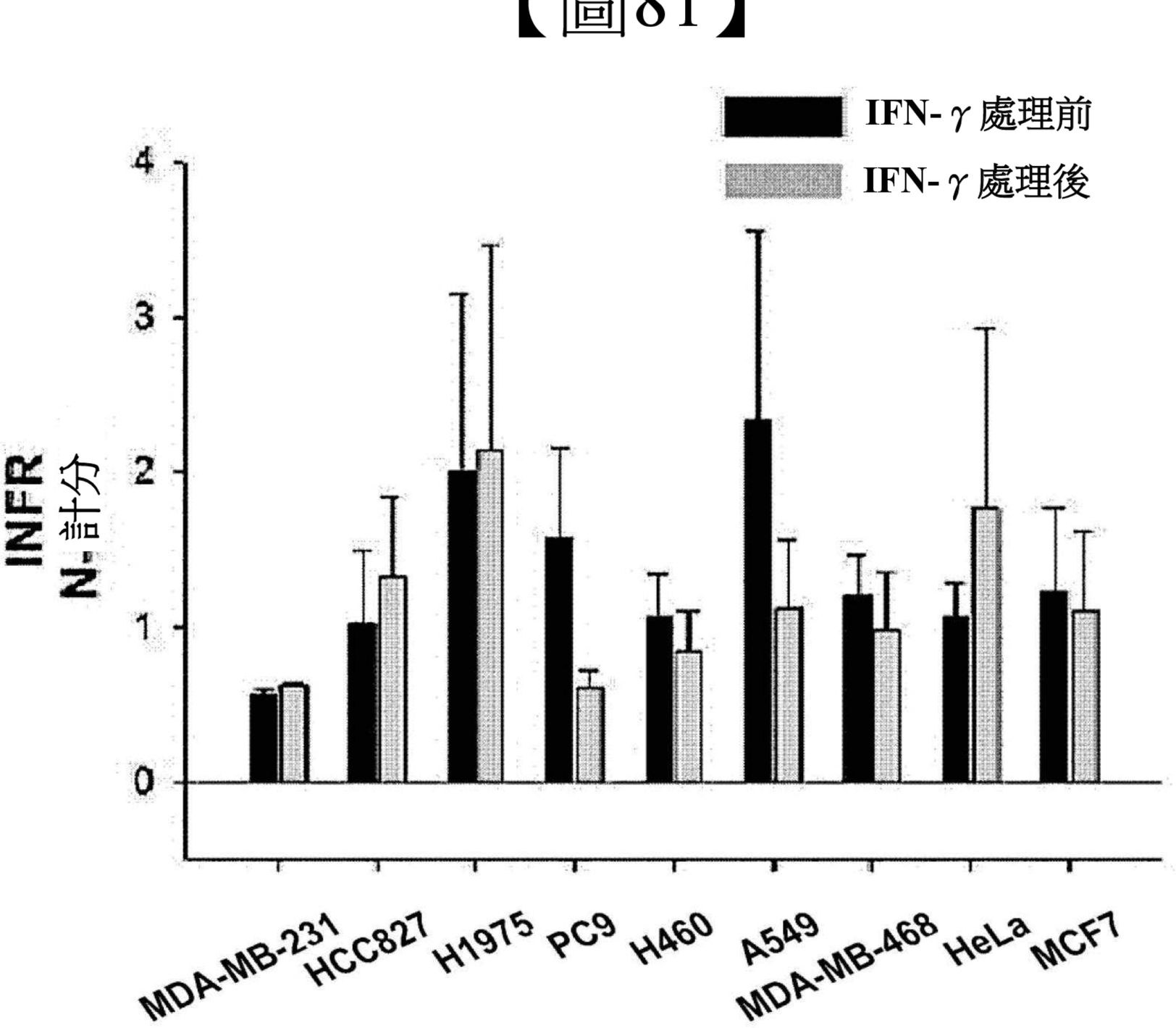
【圖79】



【圖80】

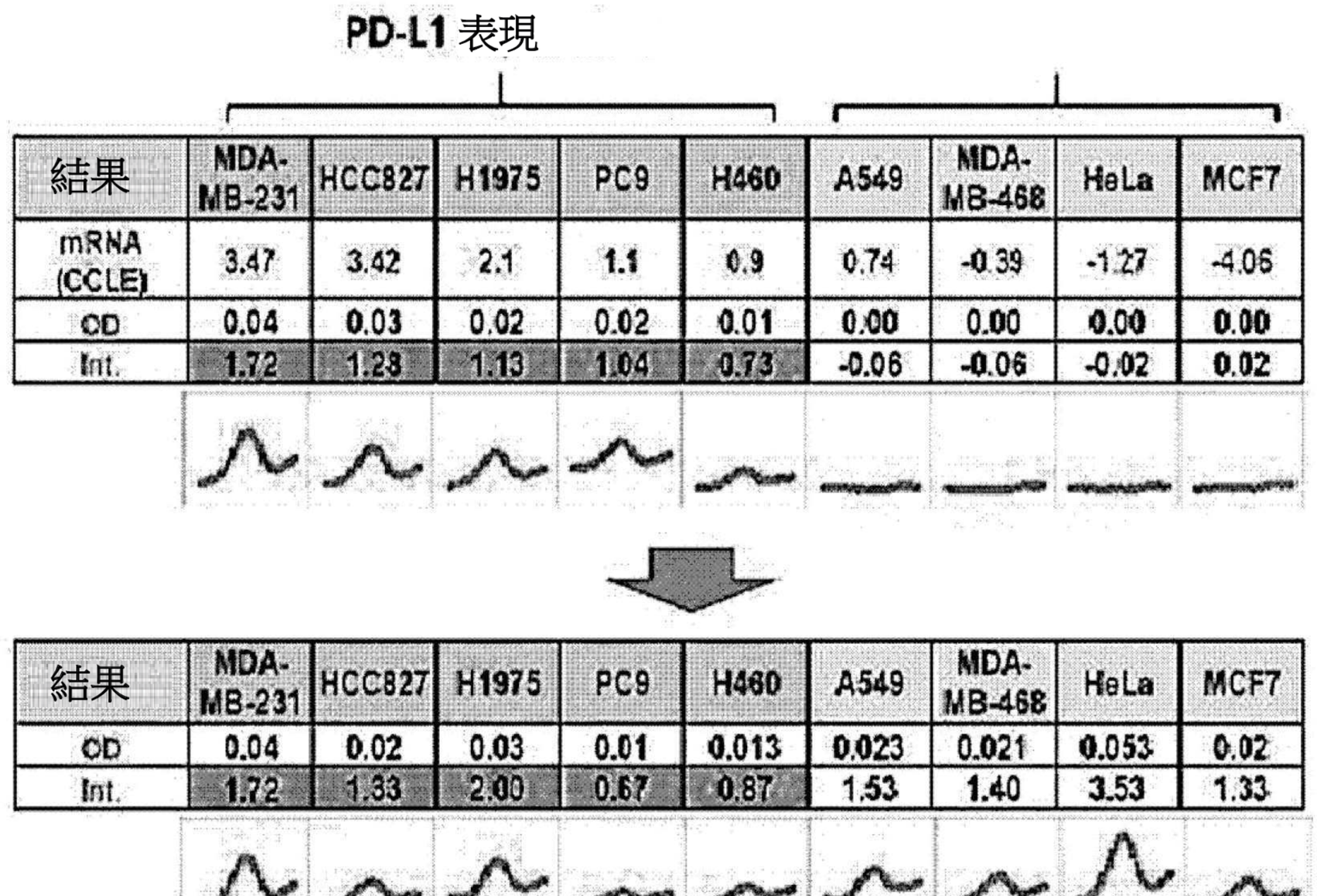

IFN-γ處理前
IFN-γ處理後
INF-γ
N-計分
4
3
2
1
0
MDA-MB-231
HCC827
H1975
PC9
H460
A549
MDA-MB-468
HeLa
MCF7

【圖81】


IFN-γ處理前
IFN-γ處理後
INFR
N-計分
4
3
2
1
0
MDA-MB-231
HCC827
H1975
PC9
H460
A549
MDA-MB-468
HeLa
MCF7

【圖82】

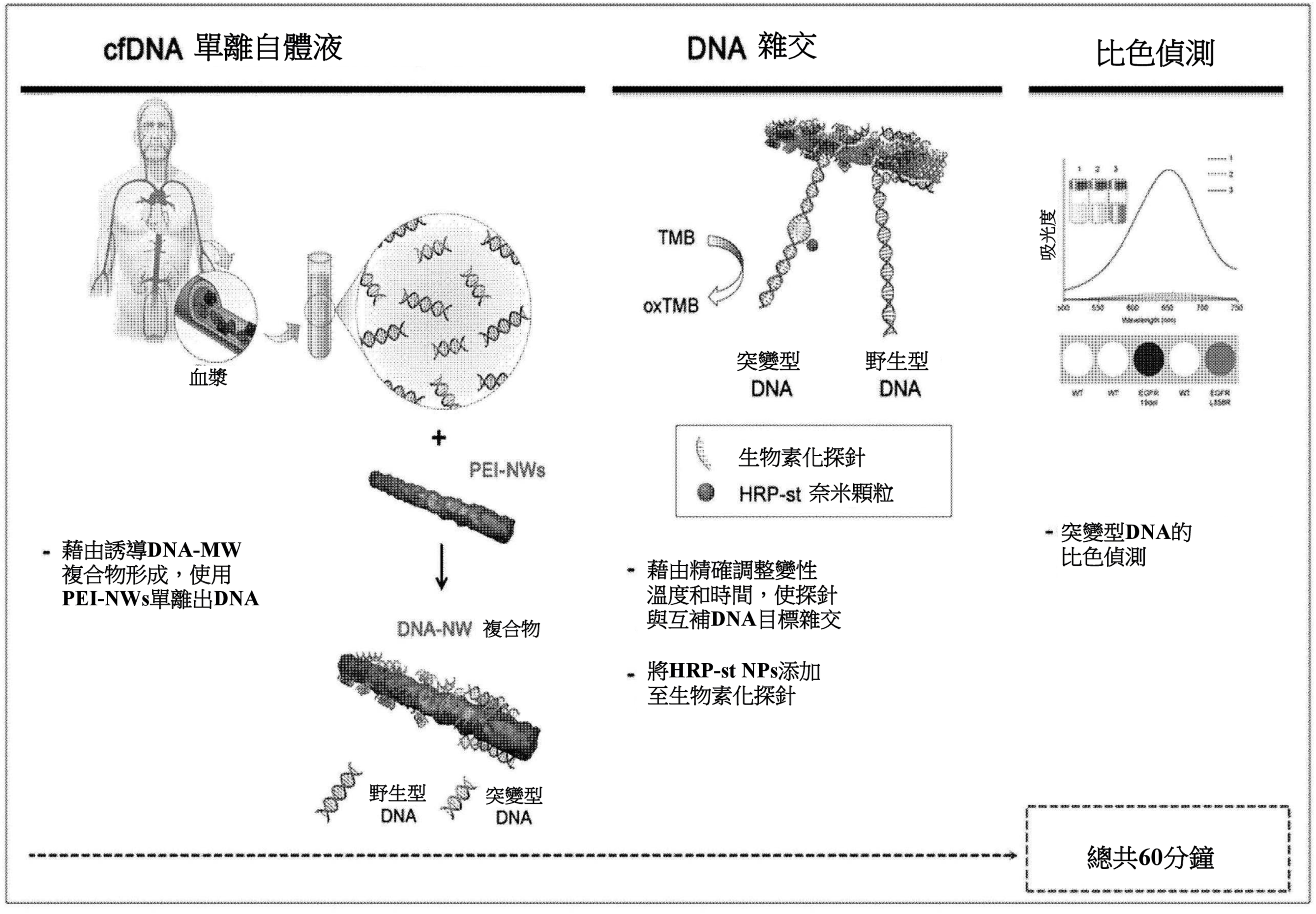
基於DNA的PD-L1偵測



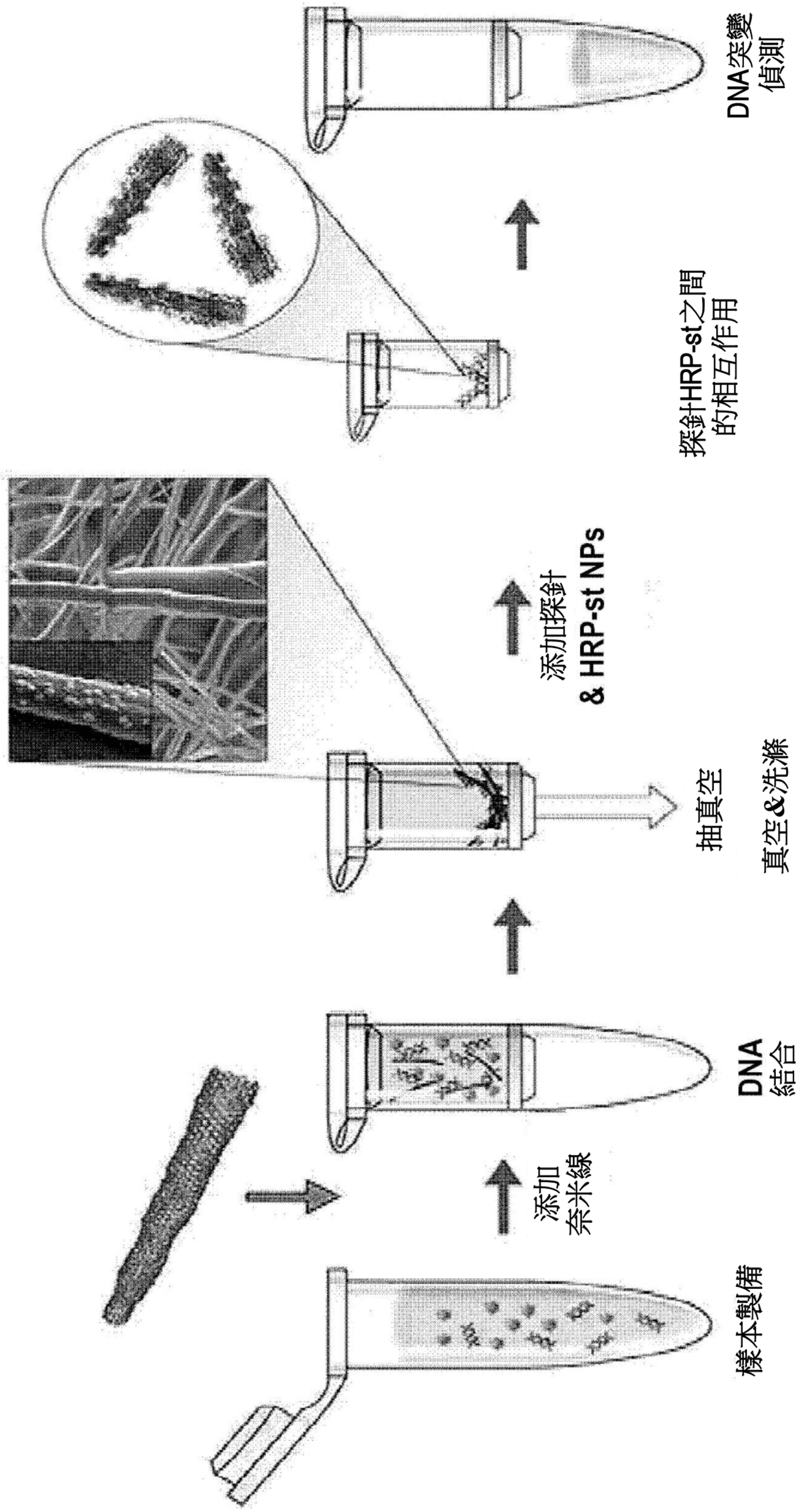
結果	MDA-MB-231	HCC827	H1975	PC9	H460	A549	MDA-MB-468	HeLa	MCF7
mRNA (CCLE)	3.47	3.42	2.1	1.1	0.9	0.74	-0.39	-1.27	-4.06
OD	0.04	0.03	0.02	0.02	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00
Int.	1.72	1.28	1.13	1.04	0.73	-0.06	-0.06	-0.02	0.02

結果	MDA-MB-231	HCC827	H1975	PC9	H460	A549	MDA-MB-468	HeLa	MCF7
OD	0.04	0.02	0.03	0.01	0.013	0.023	0.021	0.053	0.02
Int.	1.72	1.33	2.00	0.67	0.87	1.53	1.40	3.53	1.33

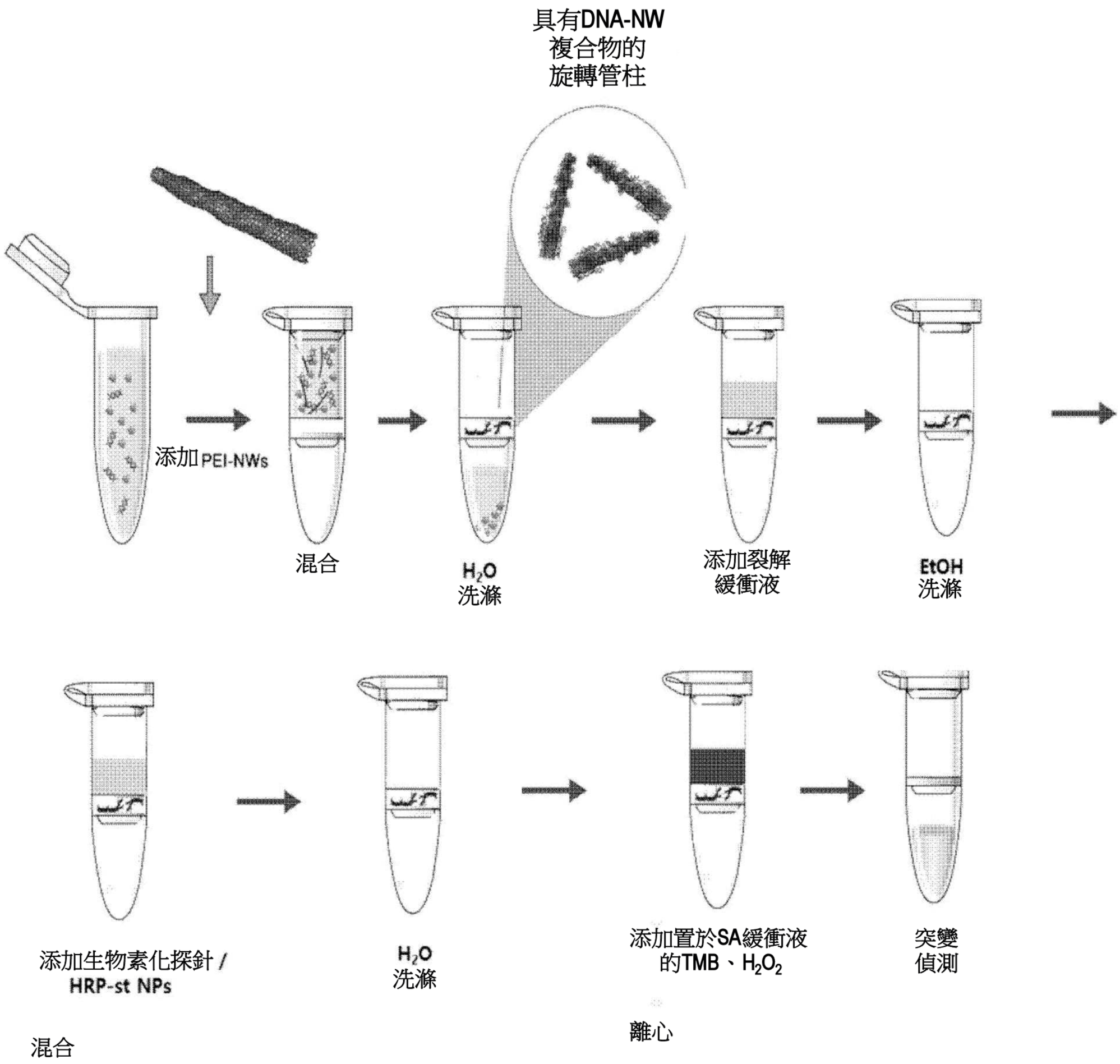
【圖83】


cfDNA 單離自體液
血漿
PEI-NWs
DNA-NW 複合物
野生型 DNA
突變型 DNA
- 藉由誘導DNA-MW 複合物形成，使用 PEI-NWs單離出DNA
DNA 雜交
TMB
oxTMB
突變型 DNA
野生型 DNA
生物素化探針
HRP-st 奈米顆粒
- 藉由精確調整變性溫度和時間，使探針與互補DNA目標雜交
- 將HRP-st NPs添加至生物素化探針
比色偵測
吸光度
- 突變型DNA的比色偵測
總共60分鐘

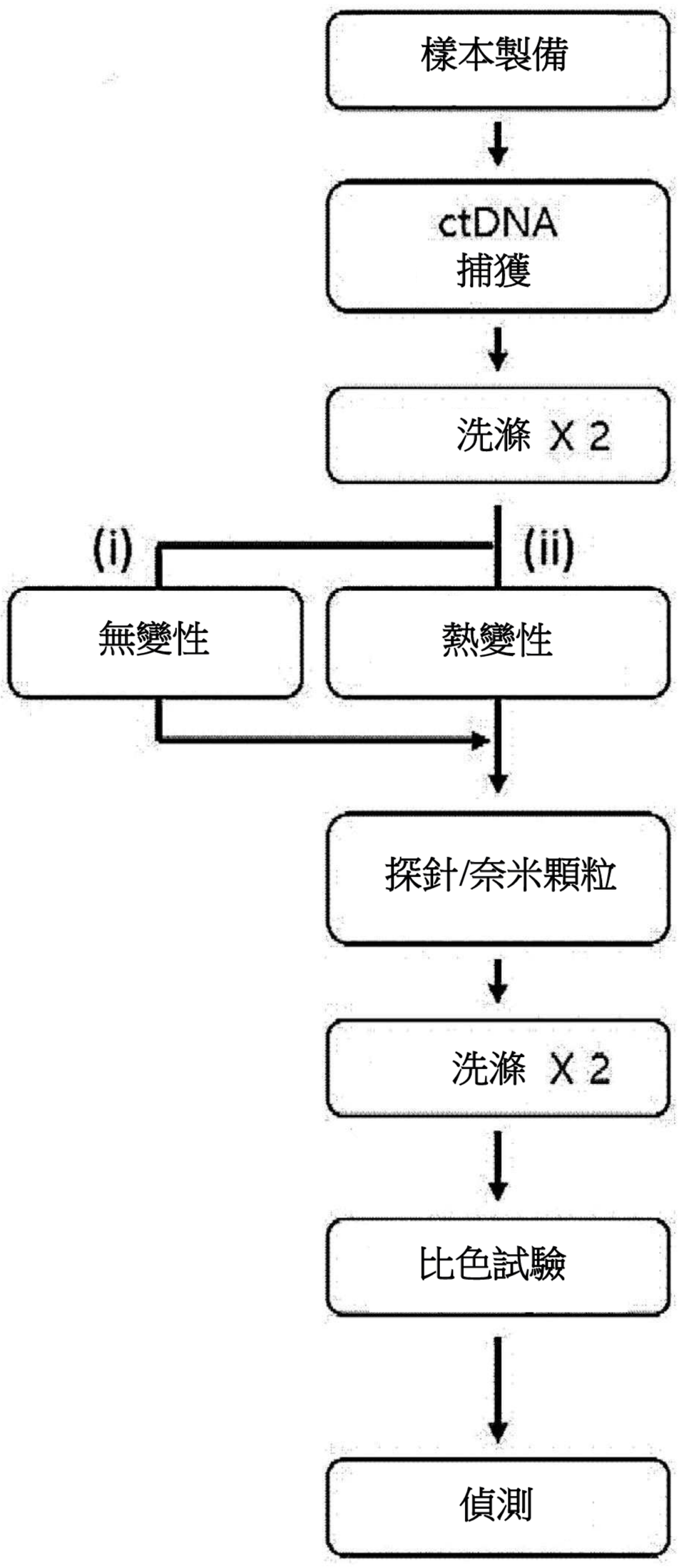
【圖84a】


DNA突變
偵測
探針HRP-st之間
的相互作用
抽真空&洗滌
添加探針
& HRP-st NPs
DNA
結合
添加
奈米線
樣本製備

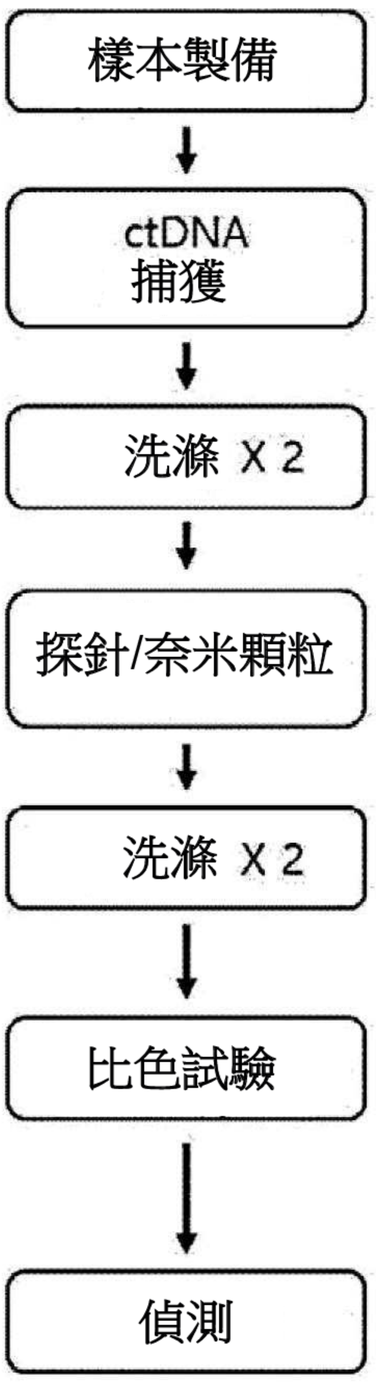
【圖84b】


具有DNA-NW
複合物的
旋轉管柱
添加 PEI-NWs
混合
H_2O
洗滌
添加裂解
緩衝液
EtOH
洗滌
添加生物素化探針 /
HRP-st NPs
混合
H_2O
洗滌
添加置於SA緩衝液
的TMB、H_2O_2
離心
突變
偵測

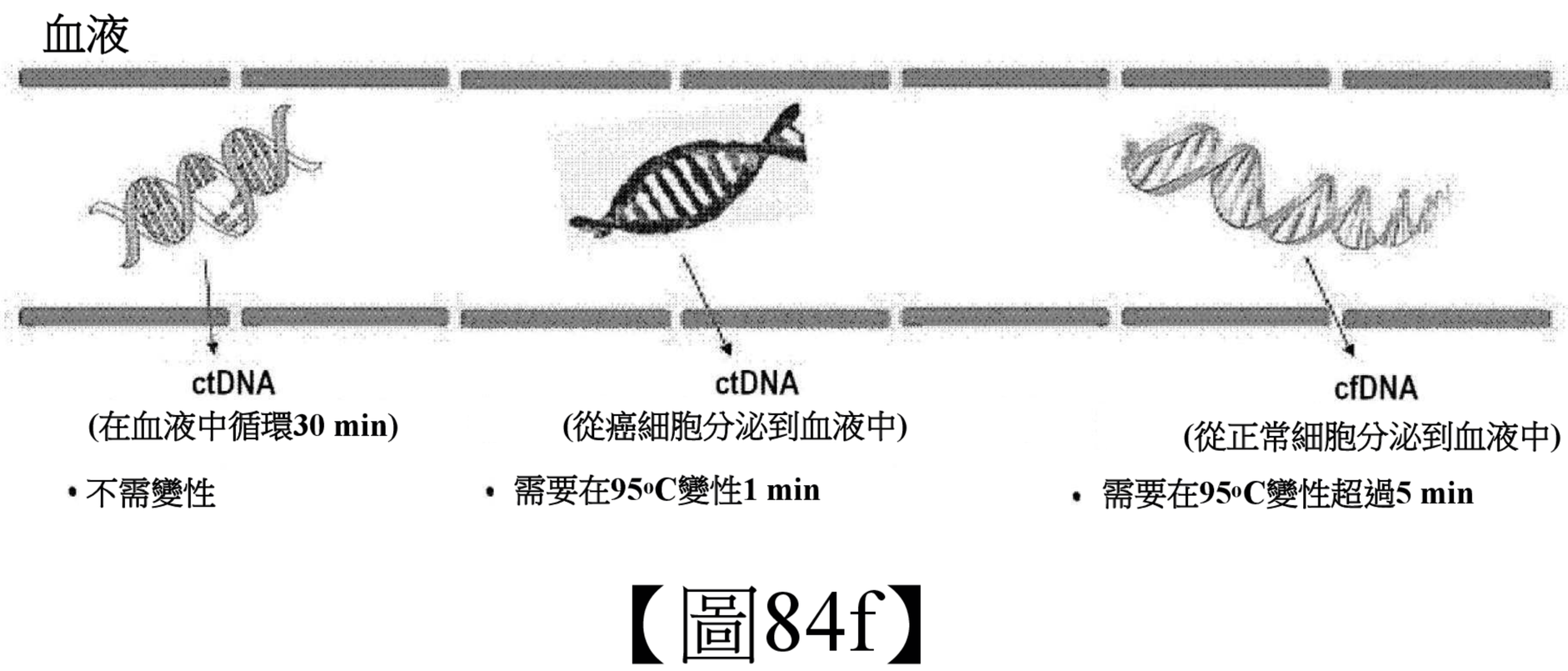
【圖84c】



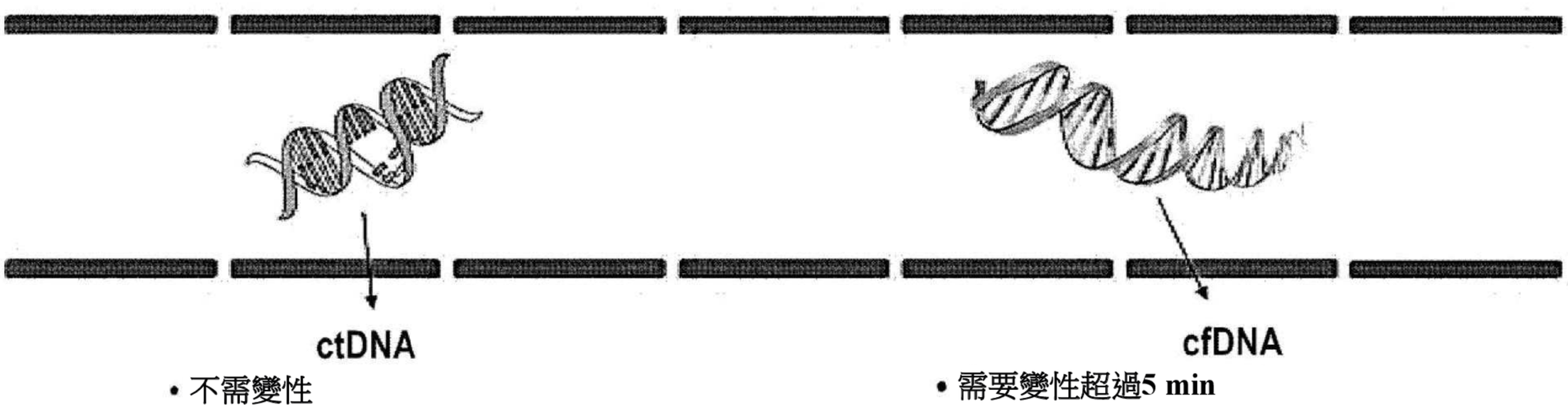
【圖84d】


樣本製備
ctDNA
捕獲
洗滌 X 2
探針/奈米顆粒
洗滌 X 2
比色試驗
偵測

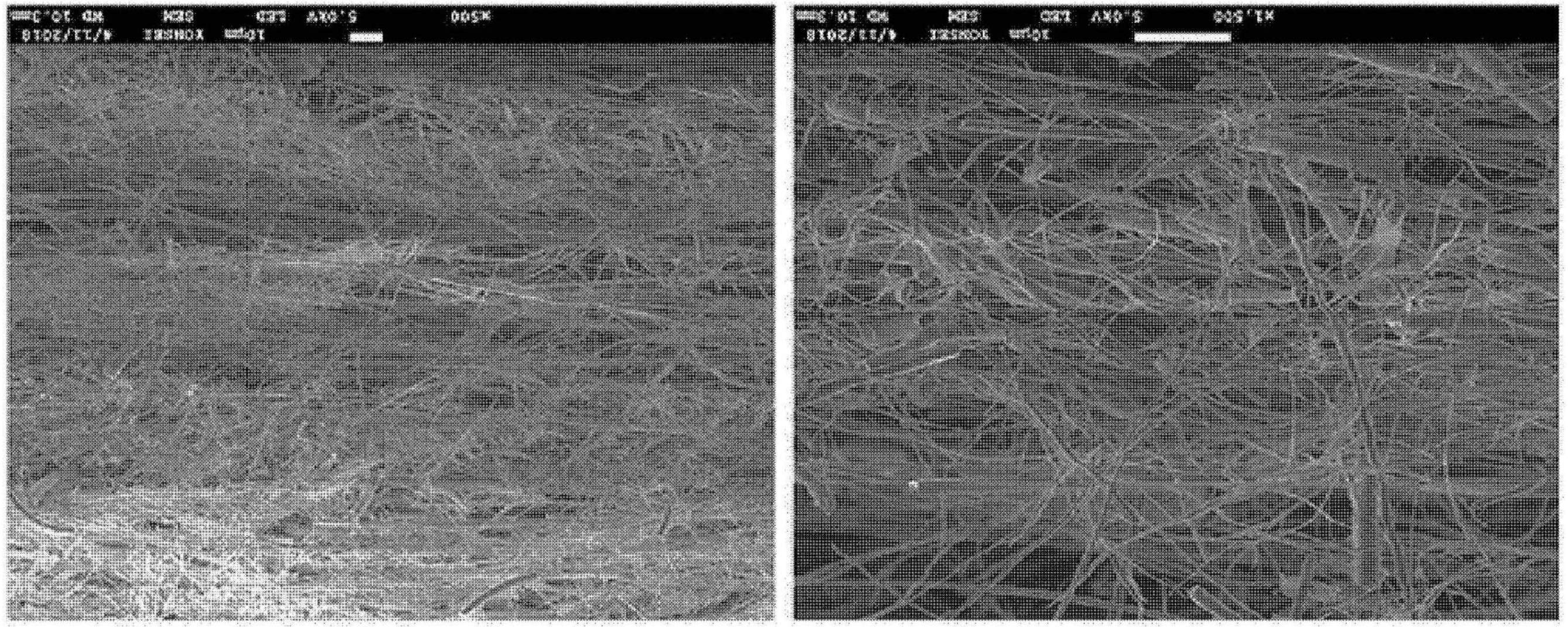
【圖84e】


血液
ctDNA
(在血液中循環30 min)
• 不需變性
ctDNA
(從癌細胞分泌到血液中)
• 需要在95°C變性1 min
cfDNA
(從正常細胞分泌到血液中)
• 需要在95°C變性超過5 min

【圖84f】



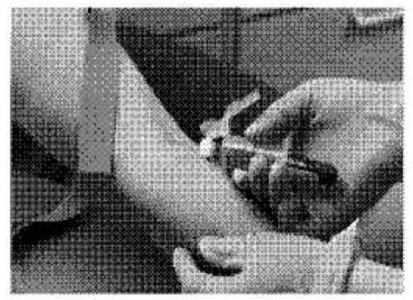
【圖84g】



【圖85】

使用的血漿量 (總計 μL)

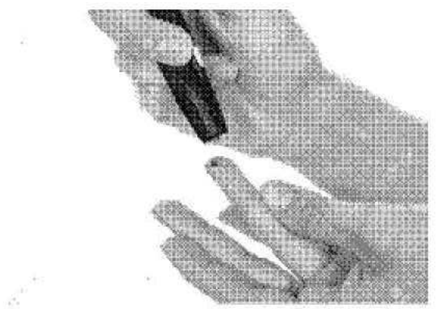
組織 NGS : PIK3CA (2019/01/29)



來自肺癌患者的靜脈血液 - 藉由針收集

波長	G719X	外顯子 19del	外顯子 20 ins	S768I	T790M	C797S	L858R	L861Q	RET	ROS	ALK 融合	ALK 點突變	c-MET	c-MET 外顯子 14 跳躍	PD-L1	KRAS G12X/ G13X	KRAS Q61X	KRAS K117X/ A146X	BRAF V600E	OGT	PIK3CA	HER2	PC	NC
500	0.038	0.039	0.048	0.045	0.042	0.039	0.039	0.04	0.04	0.039	0.048	0.04	0.04	0.051	0.039	0.037	0.038	0.039	0.039	0.038	0.045	0.038	0.046	0.04
650	0.04	0.039	0.045	0.043	0.042	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.083	0.039	0.038	0.048	0.038	0.035	0.038	0.039	0.04	0.036	0.075	0.039	0.062	0.04
OD	0.002	0	-0.003	-0.002	0	0	0	-0.001	-0.001	0	0.035	-0.001	-0.002	-0.003	-0.001	-0.002	0	0	0.001	-0.002	0.03	0.001	0.016	0
N- 計分	0.13	0.00	-0.19	-0.13	0.00	0.00	0.00	-0.06	-0.06	0.00	2.19	-0.06	-0.13	-0.19	-0.06	-0.13	0.00	0.00	0.06	-0.13	1.88	0.06	1.00	

【圖86】



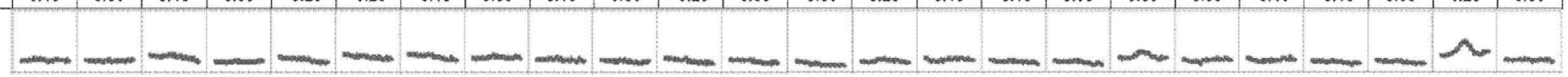
來自肺癌患者的微血管血液-藉由採血針收集

波長	G719X	外顯子19del	外顯子20ins	S768I	T790M	C797S	L858R	L861Q	RET	ROS	ALK融合	ALK點突變	c-MET	c-MET外顯子14跳躍	PD-L1	KRAS G12X/G13X	KRAS Q61X	KRAS K117X/A146X	BRAF V600E	OGT	PIK3CA	HER2	PC	NC
500	0.04	0.04	0.04	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.038	0.039	0.045	0.038	0.04	0.04	0.04	0.039	0.039	0.04	0.039	0.039	0.046	0.039	0.042	0.039
650	0.039	0.038	0.04	0.038	0.04	0.038	0.039	0.037	0.038	0.038	0.062	0.039	0.038	0.039	0.038	0.04	0.039	0.039	0.037	0.037	0.07	0.038	0.047	0.038
OD	-0.001	-0.002	0	-0.001	0.001	-0.001	0	-0.002	0	-0.001	0.017	0.001	-0.002	-0.001	-0.002	0.001	0	-0.001	-0.002	-0.002	0.024	-0.001	0.005	-0.001
N- 計分	-0.06	-0.13	0.00	-0.06	0.06	-0.06	0.00	-0.13	0.00	-0.06	1.06	0.06	-0.13	-0.06	-0.13	0.06	0.00	-0.06	-0.13	-0.13	1.50	-0.06		

【圖87】

來自正常人的靜脈血液-藉由針收集

波長	G719X	外顯子19del	外顯子20ins	S768I	T790M	C797S	L858R	L861Q	RET	ROS	ALK融合var.1	ALK融合var.3	ALK突變	c-MET	c-MET外顯子14跳躍	PD-L1	KRAS G12X/G13X	KRAS Q61X	KRAS K117X/A146X	BRAF V600E	FGFR amp.	PIC3CA	PC	NC
500	0.042	0.043	0.047	0.042	0.046	0.048	0.048	0.044	0.043	0.043	0.044	0.043	0.042	0.042	0.044	0.043	0.042	0.045	0.043	0.044	0.042	0.042	0.047	0.043
650	0.043	0.043	0.048	0.042	0.044	0.046	0.047	0.047	0.044	0.043	0.042	0.043	0.039	0.044	0.045	0.042	0.042	0.051	0.043	0.043	0.041	0.042	0.059	0.043
O.D	0.001	0	0.001	0.000	-0.002	-0.002	-0.001	0.003	0.001	0	-0.002	0	-0.003	0.002	0.001	-0.001	0	0.006	0	-0.001	-0.001	0	0.012	0
N-計分	0.10	0.00	0.10	0.00	-0.20	-0.20	-0.10	0.30	0.10	0.00	-0.20	0.00	-0.30	0.20	0.10	-0.10	0.00	0.60	0.00	-0.10	-0.10	0.00	1.20	0.00

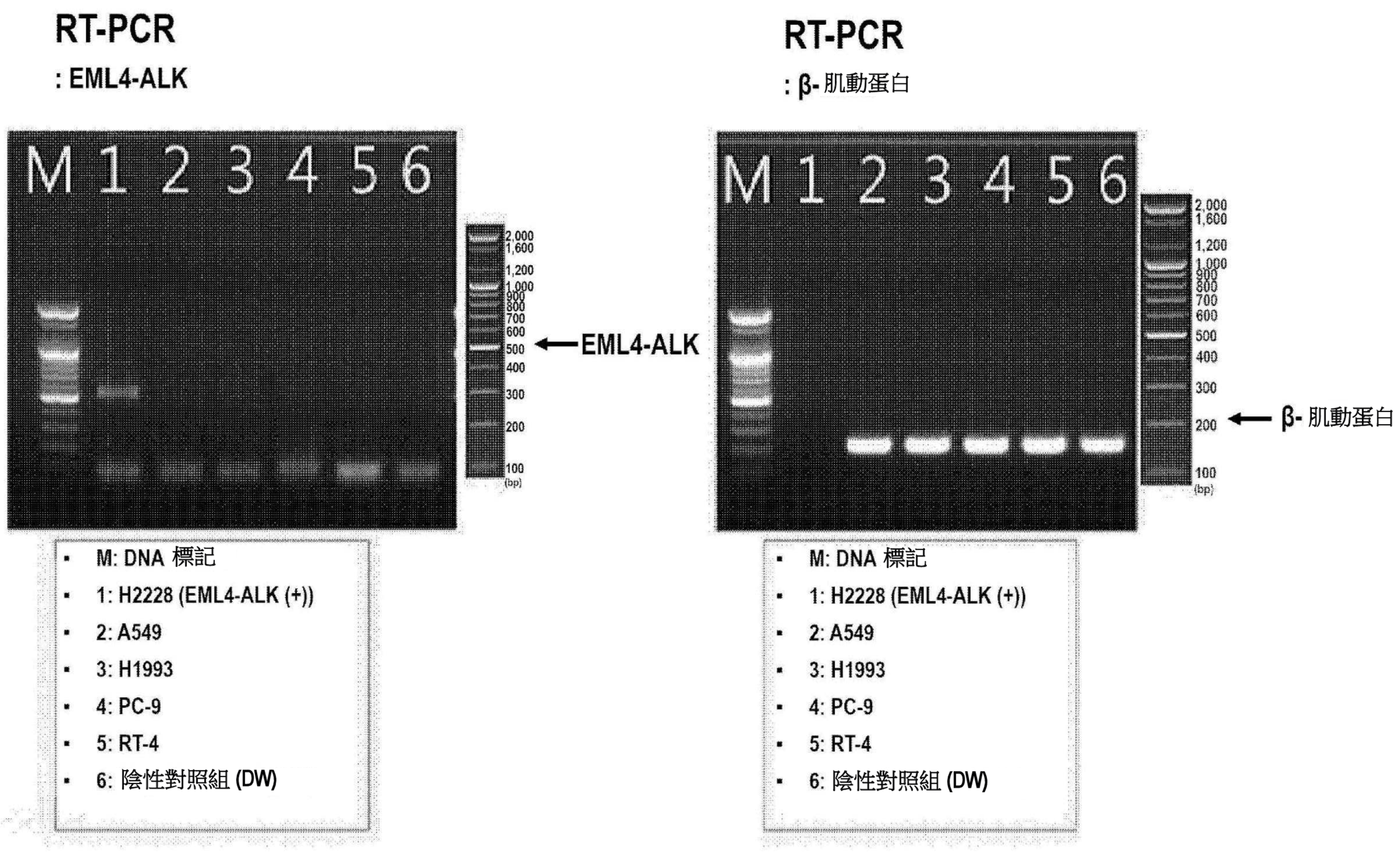


【圖88】

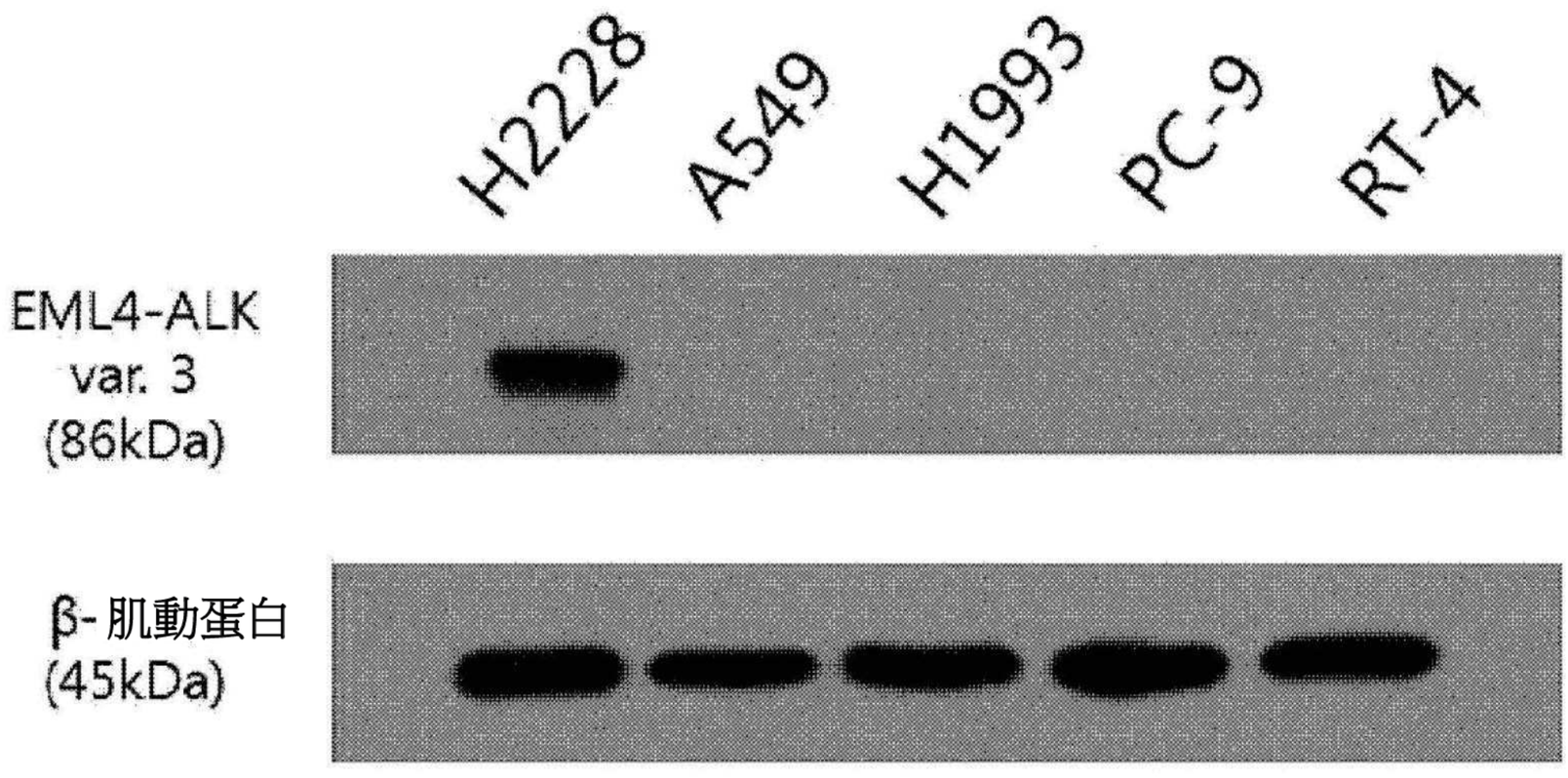
來自正常個體的微血管血液-藉由採血針收集

波長	G719X	外顯子19 del	外顯子 20 ins	S768I	T790M	C797S	L858R	L861Q	RET	ROS	ALK 融合 var.1	ALK 融合 var.3	ALK 突變	c-MET	c-MET 外顯子14 跳躍	PD_L1	KRAS G12X/ G13X	KRAS Q61X	KRAS K117X/ A146X	BRAF V600E	FGFR amp.	PIC3CA	PC	NC
500	0.04	0.041	0.05	0.045	0.046	0.044	0.041	0.043	0.041	0.043	0.042	0.042	0.041	0.042	0.041	0.042	0.043	0.045	0.042	0.043	0.042	0.044	0.049	0.043
650	0.042	0.041	0.047	0.043	0.047	0.044	0.04	0.041	0.041	0.043	0.039	0.042	0.039	0.043	0.039	0.045	0.041	0.044	0.042	0.042	0.041	0.042	0.07	0.045
OD	0.002	0	-0.003	-0.002	0.001	0	-0.001	-0.002	0	0	-0.003	0	-0.002	0.001	-0.002	0.003	-0.002	-0.001	0	-0.001	-0.001	-0.002	0.021	0.002
N- 計分	0.20	0.00	-0.30	-0.20	0.10	0.00	-0.10	-0.20	0.00	0.00	-0.30	0.00	-0.20	0.10	-0.20	0.30	-0.20	-0.10	0.00	-0.10	-0.10	-0.20	2.10	0.20

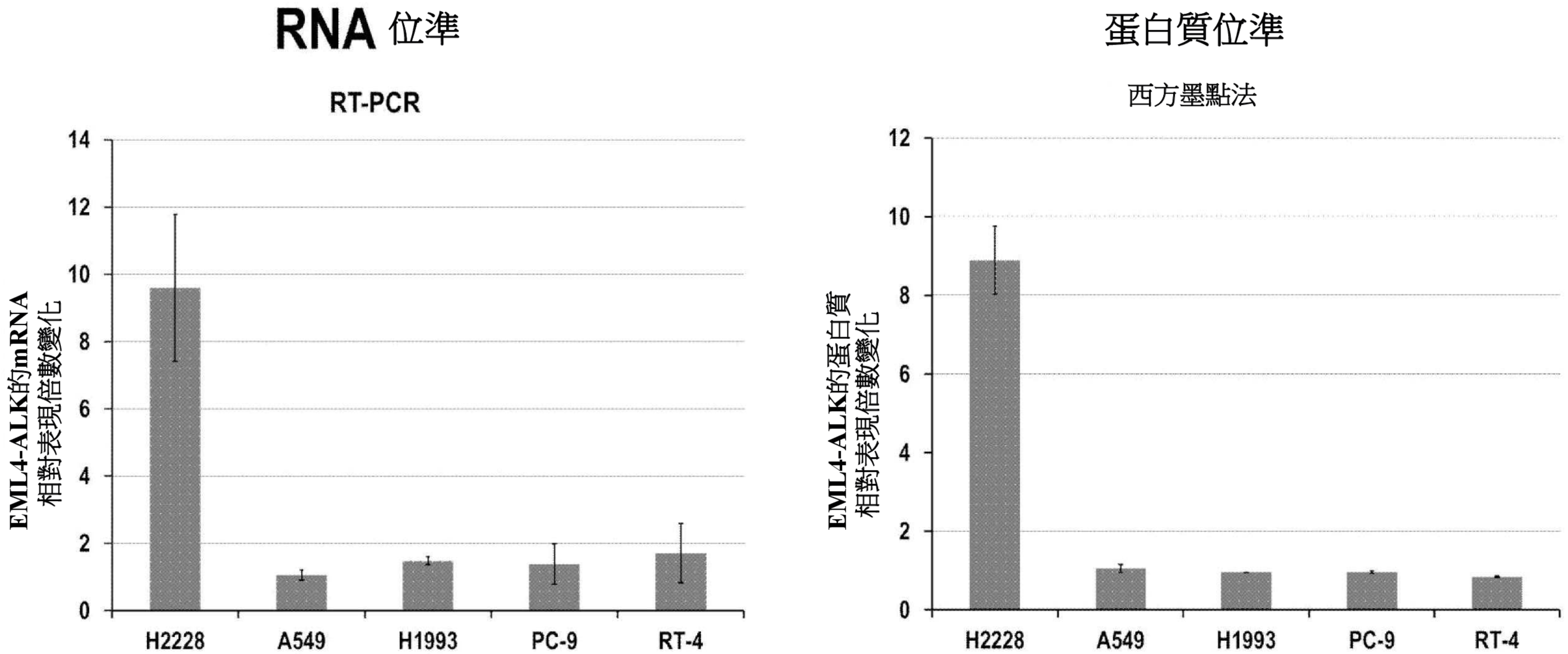
【圖89】


RT-PCR
: EML4-ALK
M 1 2 3 4 5 6
2,000
1,600
1,200
1,000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
(bp)
EML4-ALK
M: DNA 標記
1: H2228 (EML4-ALK (+))
2: A549
3: H1993
4: PC-9
5: RT-4
6: 陰性對照組 (DW)
RT-PCR
: β- 肌動蛋白
M 1 2 3 4 5 6
2,000
1,600
1,200
1,000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
(bp)
β- 肌動蛋白
M: DNA 標記
1: H2228 (EML4-ALK (+))
2: A549
3: H1993
4: PC-9
5: RT-4
6: 陰性對照組 (DW)

【圖90】



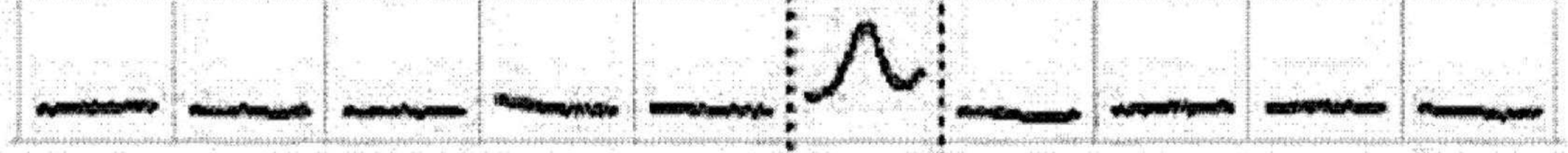
【圖91】


RNA 位準
RT-PCR
EML4-ALK的mRNA
相對表現倍數變化
14
12
10
8
6
4
2
0
H2228
A549
H1993
PC-9
RT-4
蛋白質位準
西方墨點法
EML4-ALK的蛋白質
相對表現倍數變化
12
10
8
6
4
2
0
H2228
A549
H1993
PC-9
RT-4

【圖92】

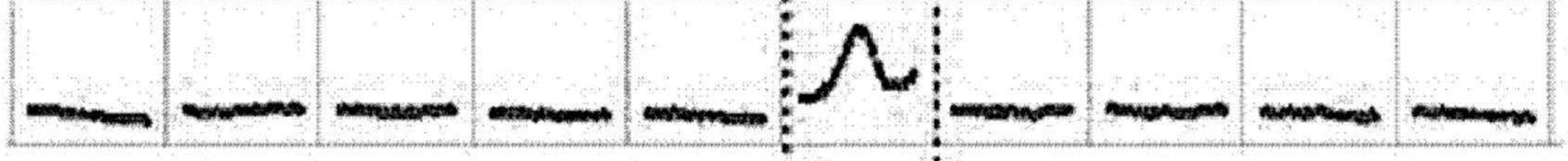
EML4-ALK var.1 探針　　**EML4-ALK var.3** 探針

波長	H2228 ALK Var1	A549 ALK Var1	H1993 ALK Var1	PC9 ALK Var1	RT4 ALK Var1	H2228 ALK Var3	A549 ALK Var3	H1993 ALK Var3	PC9 ALK Var3	RT4 ALK Var3
500	0.042	0.042	0.041	0.048	0.043	0.05	0.041	0.042	0.043	0.042
650	0.044	0.042	0.043	0.042	0.042	0.087	0.04	0.044	0.045	0.042
	0.002	0	0.002	-0.006	-0.001	0.037	-0.001	0.002	0.002	0
	0.20	0.00	0.20	-0.60	-0.10	3.70	-0.10	0.20	0.20	0.00



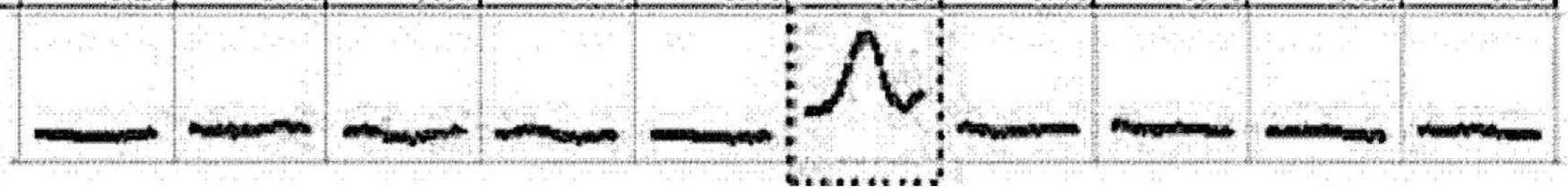
EML4-ALK var.1 探針　　**EML4-ALK var.3** 探針

波長	H2228 ALK Var1	A549 ALK Var1	H1993 ALK Var1	PC9 ALK Var1	RT4 ALK Var1	H2228 ALK Var3	A549 ALK Var3	H1993 ALK Var3	PC9 ALK Var3	RT4 ALK Var3
500	0.043	0.044	0.043	0.041	0.041	0.05	0.043	0.044	0.042	0.042
650	0.041	0.043	0.042	0.041	0.041	0.087	0.043	0.042	0.042	0.041
	-0.002	-0.001	-0.001	0	0	0.037	0	-0.002	0	-0.001
	-0.20	-0.10	-0.10	0.00	0.00	3.70	0.00	-0.20	0.00	-0.10

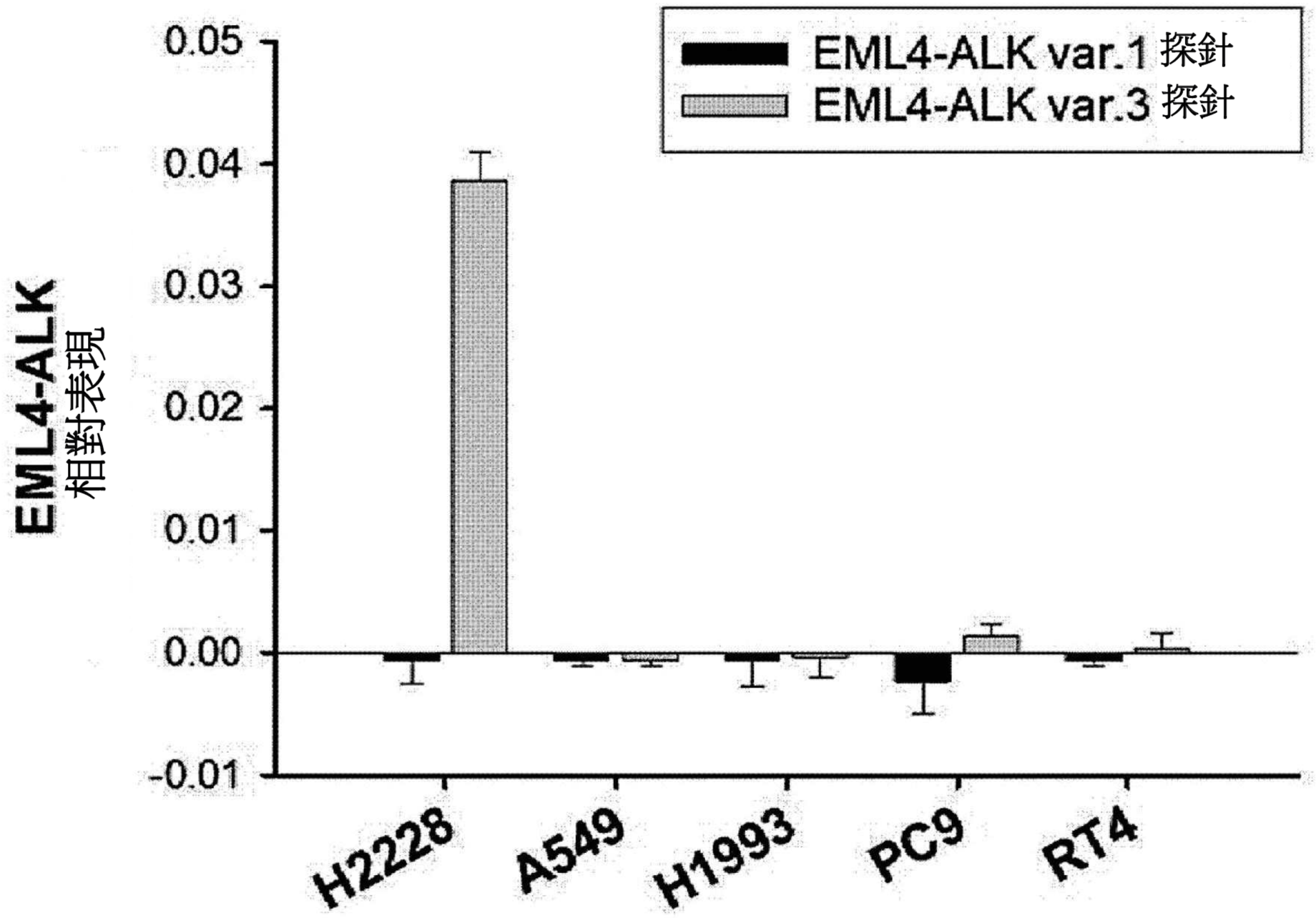


EML4-ALK var.1 探針　　**EML4-ALK var.3** 探針

波長	H2228 ALK Var1	A549 ALK Var1	H1993 ALK Var1	PC9 ALK Var1	RT4 ALK Var1	H2228 ALK Var3	A549 ALK Var3	H1993 ALK Var3	PC9 ALK Var3	RT4 ALK Var3
500	0.04	0.043	0.041	0.04	0.04	0.052	0.043	0.045	0.041	0.042
650	0.038	0.042	0.038	0.039	0.039	0.094	0.042	0.044	0.043	0.044
	-0.002	-0.001	-0.003	-0.001	-0.001	0.042	-0.001	-0.001	0.002	0.002
	-0.20	-0.10	-0.30	-0.10	-0.10	4.20	-0.10	-0.10	0.20	0.20



【圖93】


EML4-ALK var.1 探針
EML4-ALK var.3 探針
EML4-ALK
相對表現
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
-0.01
H2228
A549
H1993
PC9
RT4

【圖94】

2019-08-16 0208-665(LC#5, 血液, 積液), 復發患者

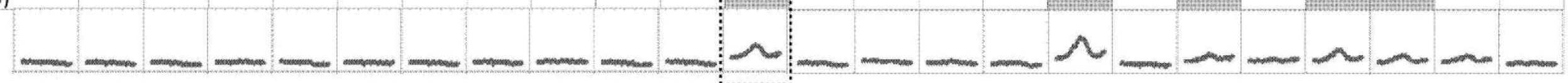
組織：野生型/ALK融合(FISH)/

小細胞肺癌 (SCLC) (經韓國癌症中心醫院診斷) / 經開立截剋瘤但無治療效果

(若有EML4-ALK融合變體，則發現對ALK抑制劑截剋瘤無回應)

SCLC 標記

波長	G719X	外顯子19del	外顯子20 ins	S768I	T790M	C797S	L858R	L861Q	RET	ROS	EML4-ALK 融合 var.1	EML4-ALK 融合 var.3	ALK 突變	c-MET	c-MET 外顯子14 跳躍	PD-L1	KRAS	BRAF V600E	SYP	CgA	NCAM1	NKX2-1	PC	NC
500	0.039	0.038	0.037	0.038	0.04	0.038	0.038	0.039	0.038	0.038	0.04	0.046	0.04	0.045	0.041	0.039	0.048	0.04	0.043	0.044	0.045	0.042	0.042	0.038
650	0.039	0.039	0.038	0.04	0.039	0.039	0.039	0.04	0.041	0.038	0.039	0.066	0.04	0.043	0.044	0.041	0.081	0.038	0.054	0.046	0.062	0.052	0.052	0.04
OD	0	0.001	0.001	0.002	-0.001	0.001	0.001	0.001	0.003	0.000	-0.001	0.020	0.000	-0.002	0.003	0.002	0.033	-0.002	0.011	0.002	0.017	0.01	0.01	0.002
N-計分 (O.D/0.01)	0.00	0.10	0.10	0.20	-0.10	0.10	0.10	0.10	0.30	0.00	-0.10	2.00	0.00	-0.20	0.30	0.20	3.30	-0.20	1.10	0.20	1.70	1.00	1.00	0.20

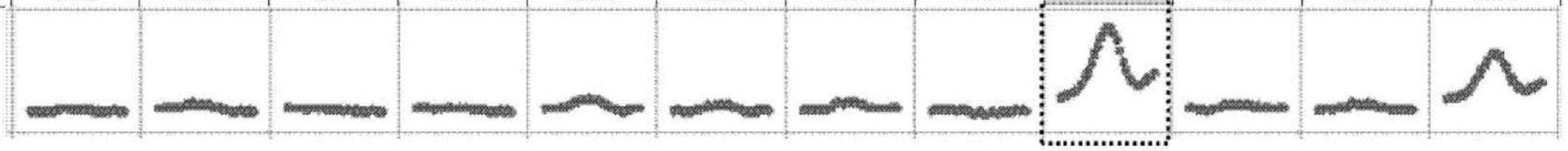


【圖95】

2019-05-13 0208-394(LC#1, 血液, 尿液, 唾液, 痰), 復發患者

組織：未偵測到 (PANAGENE) / ALK 融合陽性 (FISH)

波長	G719X	外顯子19del	外顯子20 ins	S768I	T790M	C797S	L858R	L861Q	EML4-ALK 融合 var.1	EML4-ALK 融合 var.3	ALK 突變	PC
500	0.041	0.044	0.044	0.044	0.043	0.041	0.042	0.041	0.053	0.044	0.043	0.051
650	0.043	0.047	0.043	0.044	0.051	0.047	0.048	0.04	0.111	0.047	0.048	0.089
O.D	0.002	0.003	-0.001	0	0.008	0.006	0.006	-0.001	0.058	0.003	0.005	0.038
N- 計分 (O.D/0.01)	0.20	0.30	-0.10	0.00	0.80	0.60	0.60	-0.10	5.80	0.30	0.50	3.80



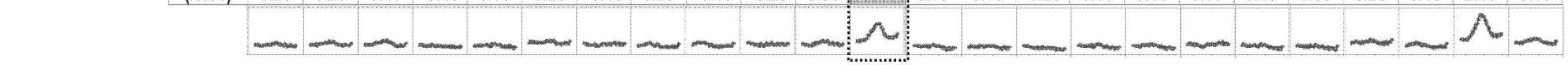
【圖96】

0208-573(33354151, 20190228 LC#2, 血液), 新患者

組織：未完成/野生型/融合變體 (ALK/EML4) (NGS)

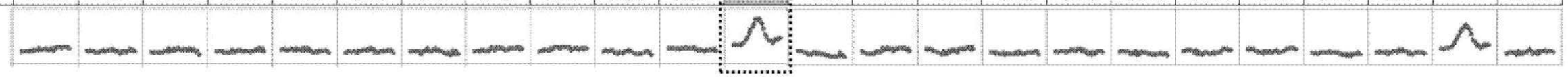
#1

波長	G719X	外顯子19del	外顯子20ins	S768I	T790M	C797S	L858R	L861Q	RET	ROS	EML4-ALK融合var.1	EML4-ALK融合var.3	ALK突變	c-MET	c-MET外顯子14跳躍	PD-L1	KRAS G12X/G13X	KRAS Q61X	KRAS K117X/A146X	BRAF V600E	FGFR amp.	PIC3CA	PC	NC
500	0.041	0.042	0.041	0.041	0.041	0.043	0.043	0.04	0.042	0.043	0.042	0.045	0.041	0.04	0.041	0.041	0.041	0.043	0.041	0.041	0.044	0.041	0.047	0.044
650	0.043	0.044	0.045	0.04	0.042	0.045	0.042	0.042	0.041	0.041	0.045	0.062	0.042	0.041	0.039	0.042	0.042	0.043	0.042	0.041	0.046	0.042	0.071	0.048
OD	0.002	0.002	0.004	-0.001	0.001	0.002	-0.001	0.002	-0.001	-0.002	0.003	0.017	0.001	0.001	-0.002	0.001	0.001	0	0.001	0	0.002	0.001	0.024	0.004
N- 計分 (/0.01)	0.20	0.20	0.40	-0.10	0.10	0.20	-0.10	0.20	-0.10	-0.20	0.30	1.70	0.10	0.10	-0.20	0.10	0.10	0.00	0.10	0.00	0.20	0.10	2.40	0.40



#2

波長	G719X	外顯子19del	外顯子20 ins	S768I	T790M	C797S	L858R	L861Q	RET	ROS	EML4-ALK融合var.1	EML4-ALK融合var.3	ALK突變	c-MET	c-MET外顯子14跳躍	PD-L1	KRAS G12X/G13X	KRAS Q61X	KRAS K117X/A146X	BRAF V600E	FGFR amp.	PIC3CA	PC	NC
500	0.041	0.042	0.041	0.042	0.043	0.041	0.042	0.042	0.041	0.042	0.044	0.046	0.043	0.043	0.044	0.042	0.042	0.042	0.042	0.044	0.041	0.042	0.044	0.041
650	0.043	0.042	0.042	0.043	0.043	0.043	0.043	0.044	0.045	0.042	0.044	0.064	0.04	0.044	0.042	0.041	0.044	0.041	0.041	0.042	0.042	0.043	0.061	0.044
OD	0.002	0	0.001	0.001	0	0.002	0.001	0.002	0.004	0	0	0.018	-0.003	0.001	-0.002	-0.001	0.002	-0.001	-0.001	-0.002	0.001	0.001	0.017	0.003
N- 計分	0.20	0.00	0.10	0.10	0.00	0.20	0.10	0.20	0.40	0.00	0.00	1.80	-0.30	0.10	-0.20	-0.10	0.20	-0.10	-0.10	-0.20	0.10	0.10	1.70	0.30

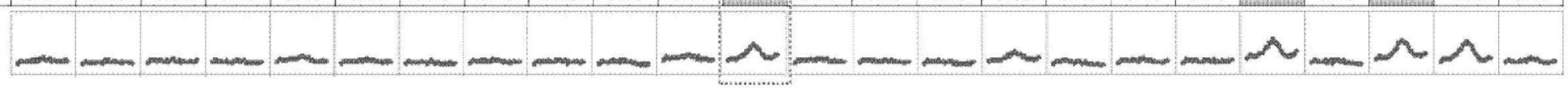


【圖97】

0208-450(33338237, 181031 LC#5, 積液), 復發患者

組織：野生型 (Panagene); ALK FISH 陽性 , BRAF 突變 (c.1799T>A, p.V600E),TP53 突變 (c.159G>A, p.W53*) (NGS)

波長	G719X	外顯子19del	外顯子20ins	S768I	T790M	C797S	L858R	L861Q	RET	ROS	EML4-ALK融合var.1	EML4-ALK融合var.3	ALK突變	c-MET	c-MET外顯子14跳躍	PD-L1	KRAS G12X/G13X	KRAS Q61X	KRAS K117X/A146X	BRAF V600E	FGFR amp.	TP53	PC	NC
500	0.039	0.038	0.039	0.039	0.04	0.038	0.038	0.039	0.038	0.037	0.042	0.041	0.038	0.039	0.038	0.04	0.038	0.039	0.039	0.043	0.039	0.042	0.04	0.039
650	0.043	0.04	0.042	0.04	0.044	0.041	0.04	0.04	0.041	0.04	0.045	0.056	0.042	0.04	0.039	0.048	0.039	0.043	0.041	0.061	0.041	0.06	0.059	0.043
OD	0.004	0.002	0.003	0.001	0.004	0.003	0.002	0.001	0.003	0.003	0.003	0.015	0.004	0.001	0.001	0.008	0.001	0.004	0.002	0.018	0.002	0.018	0.019	0.004
N- 計分 (/0.01)	0.40	0.20	0.30	0.10	0.40	0.30	0.20	0.10	0.30	0.30	0.30	1.50	0.40	0.10	0.10	0.80	0.10	0.40	0.20	1.80	0.20	1.80	1.90	0.40



【圖98】

0208-394 (20180628_LC#2 血液)

組織：未偵測到 /融合變體 (ALK/EML4) (NGS)

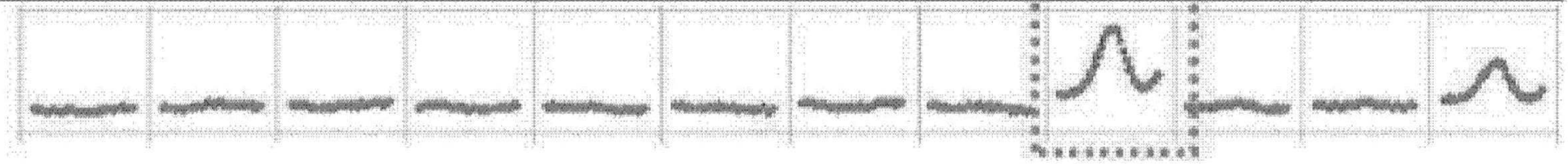
波長	G719X	外顯子 19del	外顯子 20ins	S768I	T790M	C797S	L858R	L861Q	EML4-ALK 融合 var.1	EML4-ALK 融合 var.3	ALK 突變	NC
500	0.039	0.038	0.04	0.039	0.038	0.039	0.039	0.039	0.043	0.039	0.04	0.04
650	0.043	0.041	0.041	0.041	0.041	0.04	0.039	0.04	0.066	0.043	0.044	0.044
OD	0.004	0.003	0.001	0.002	0.003	0.001	0	0.001	0.023	0.004	0.004	0.004
N- 計分 (/0.01)	0.40	0.30	0.10	0.20	0.30	0.10	0.00	0.10	2.30	0.40	0.40	0.40

【圖99】

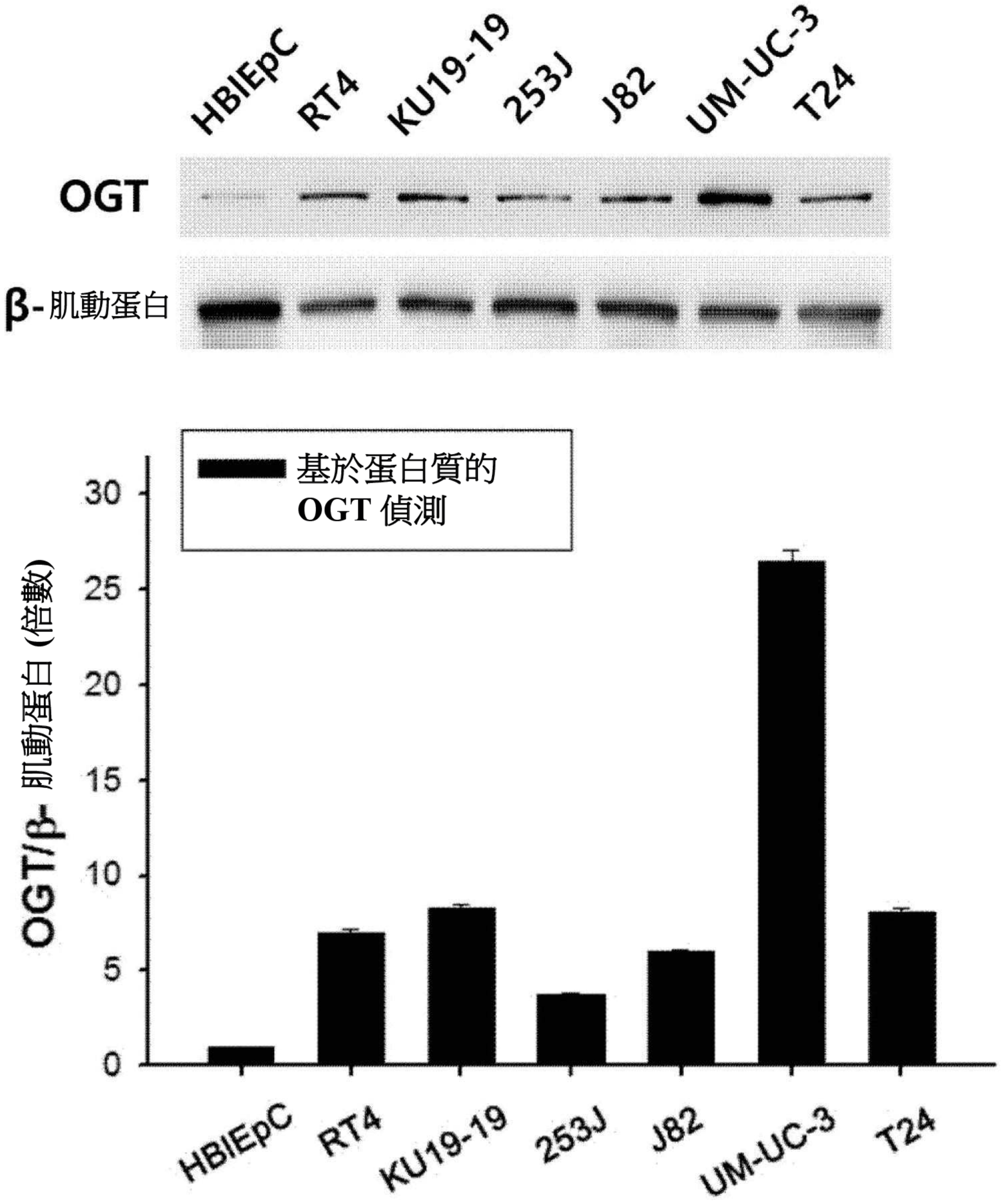
0208-352 (20180427_LC#1 血液)

組織：未偵測到 /立克癌(ceritinib), 安立適(alectinib)血液收集當時的PD狀態

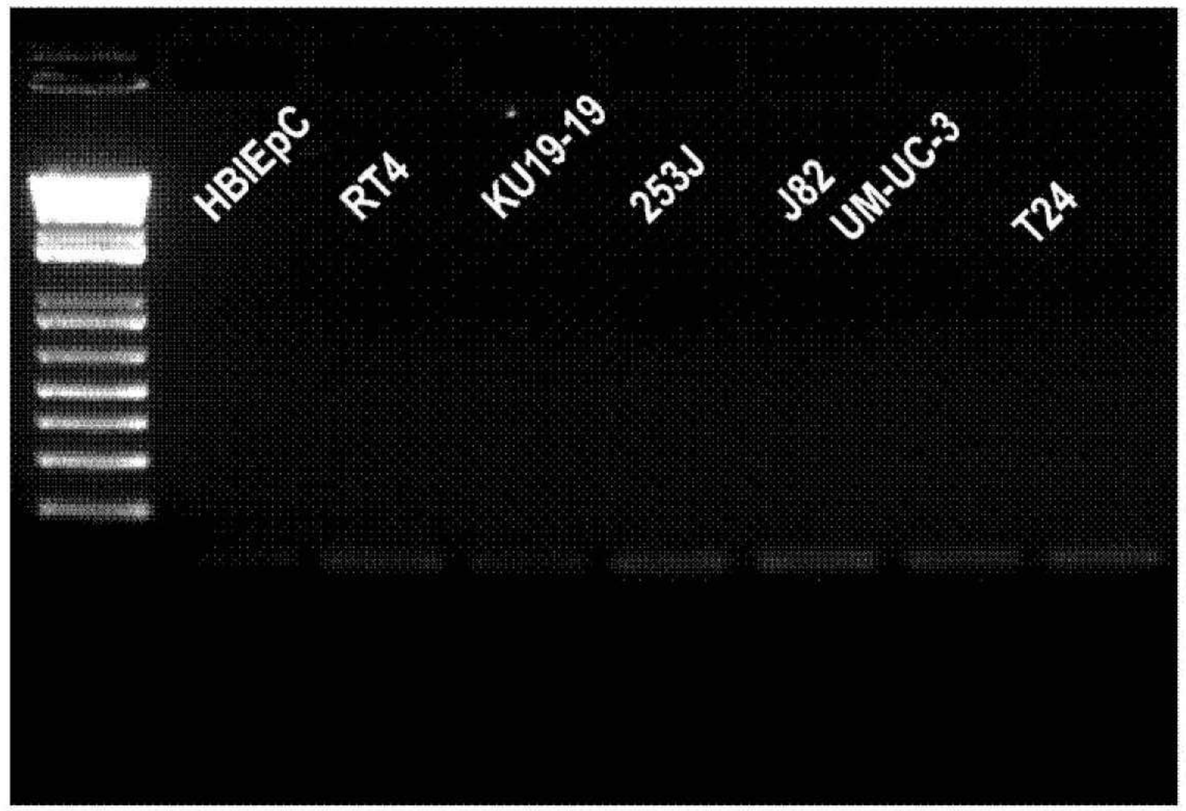
波長	G719X	外顯子 19del	外顯子 20ins	S7681	T790M	C797S	L858R	L861Q	EML4-ALK 融合 var.1	EML4-ALK 融合 var.3	ALK 突變	PC
500	0.04	0.041	0.043	0.042	0.042	0.042	0.044	0.043	0.05	0.042	0.043	0.046
650	0.038	0.043	0.043	0.04	0.041	0.042	0.042	0.042	0.092	0.045	0.044	0.07
OD	-0.002	0.002	0	-0.002	-0.001	0	-0.002	-0.001	0.042	0.003	0.001	0.024
N- 計分 (0.01)	-0.20	0.20	0.00	-0.20	-0.10	0.00	-0.20	-0.10	4.20	0.30	0.10	2.40

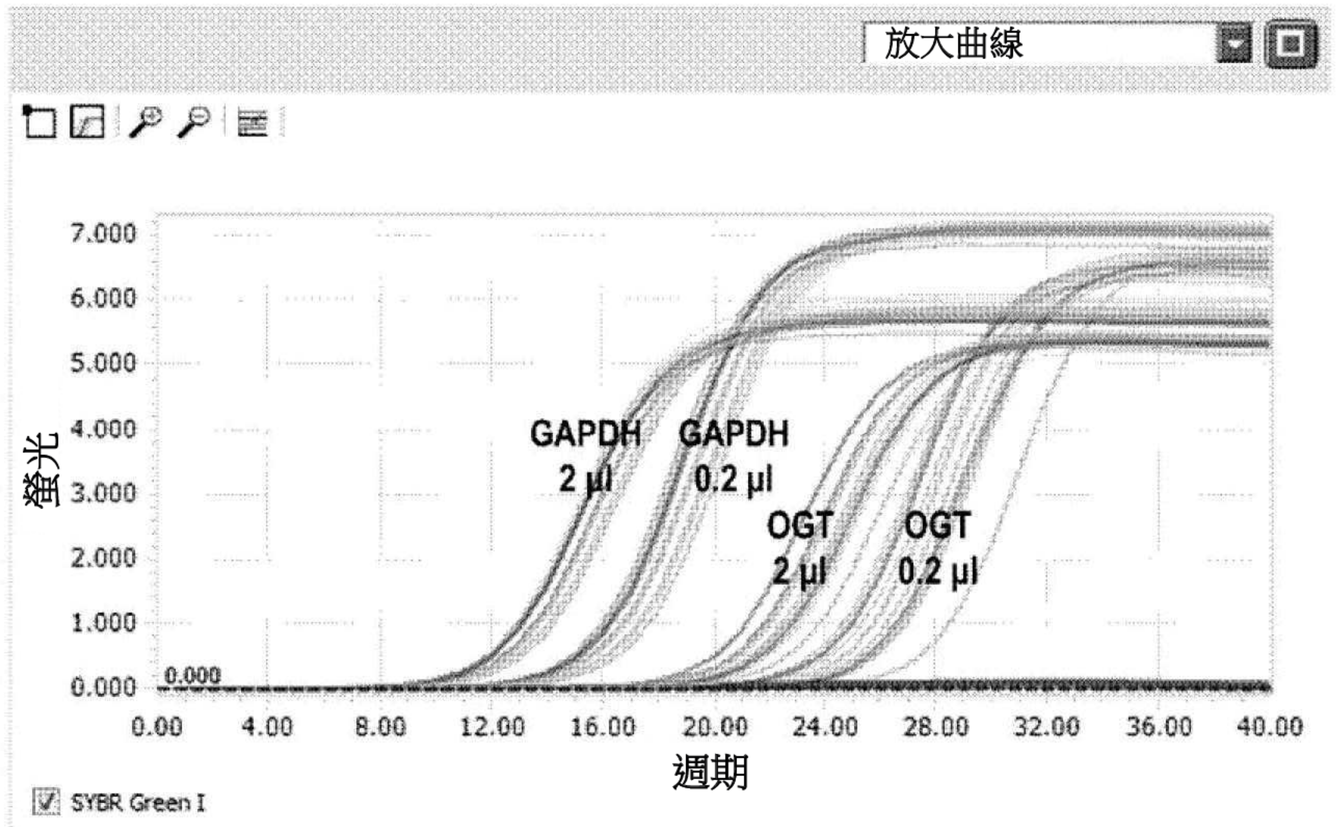


【圖100】

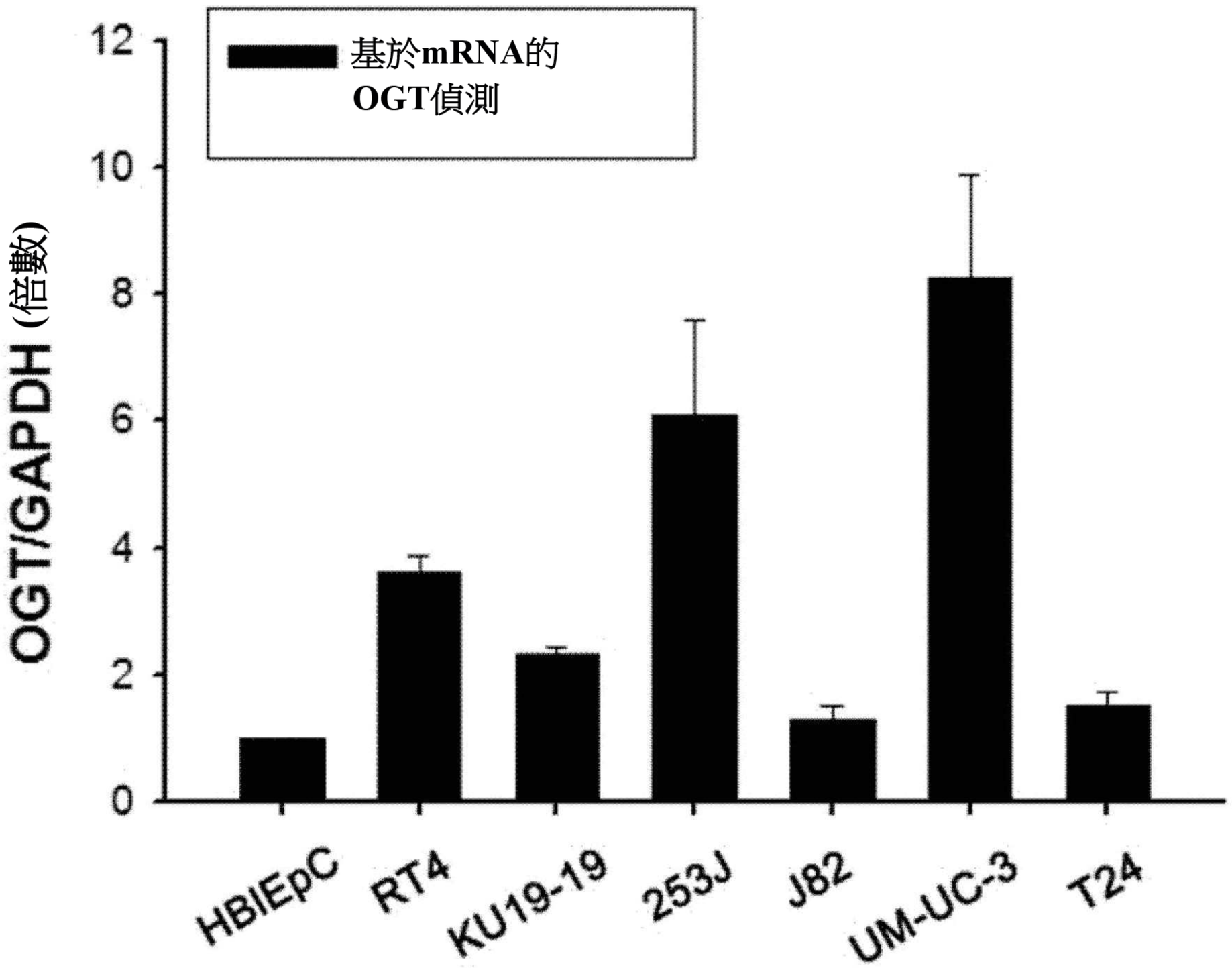

HBlEpC
RT4
KU19-19
253J
J82
UM-UC-3
T24
OGT
β-肌動蛋白
基於蛋白質的
OGT 偵測
OGT/β- 肌動蛋白 (倍數)
0
5
10
15
20
25
30
HBlEpC
RT4
KU19-19
253J
J82
UM-UC-3
T24

【圖101】

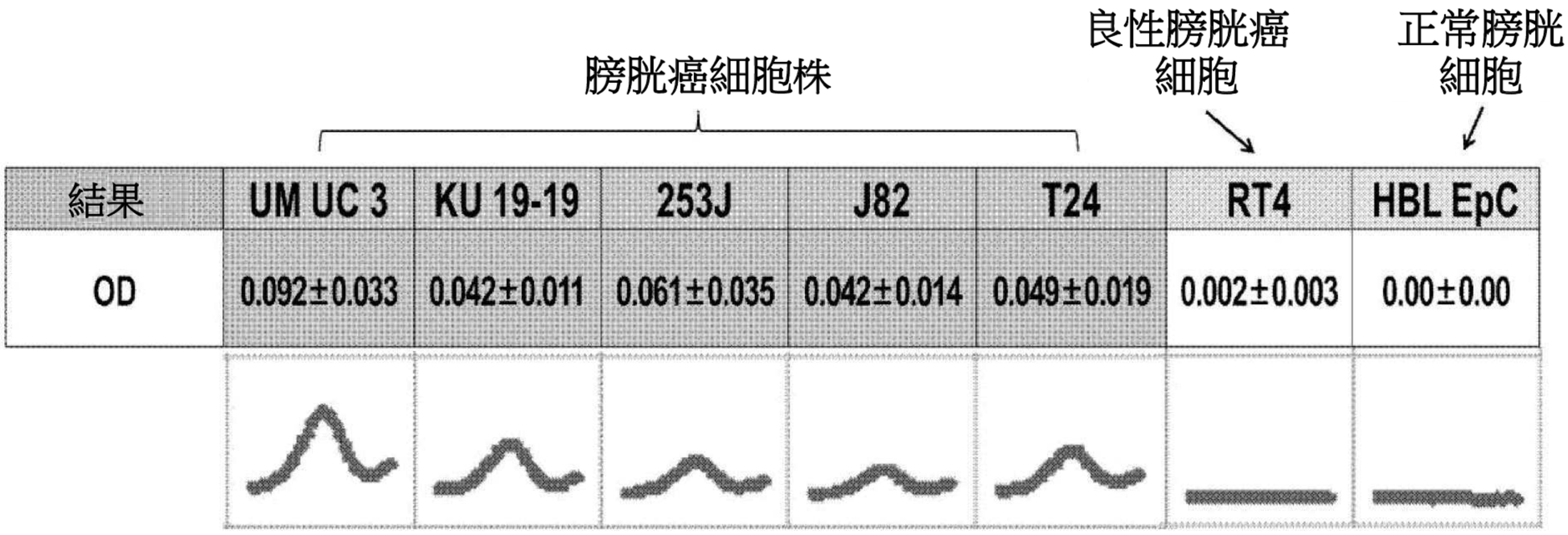

OGT
HBIEpC
RT4
KU19-19
253J
J82
UM-UC-3
T24
GAPDH
HBIEpC
RT4
KU19-19
253J
J82
UM-UC-3
T24


放大曲線
螢光
週期
GAPDH 2 µl
GAPDH 0.2 µl
OGT 2 µl
OGT 0.2 µl
SYBR Green I
熱區圖
OGT/HBIEpC
OGT/RT4
OGT/253J
OGT/J82
OGT/T24
OGT/KU19-19
OGT/UM-UC-3
GAPDH/HBIEpC
GAPDH/RT4
GAPDH/253J
GAPDH/J82
GAPDH/T24
GAPDH/KU19-19
GAPDH/UM-UC-3
26.28
10.35
N/A
SYBR Green I
Call
Cq
EPF
Flag

【圖102】

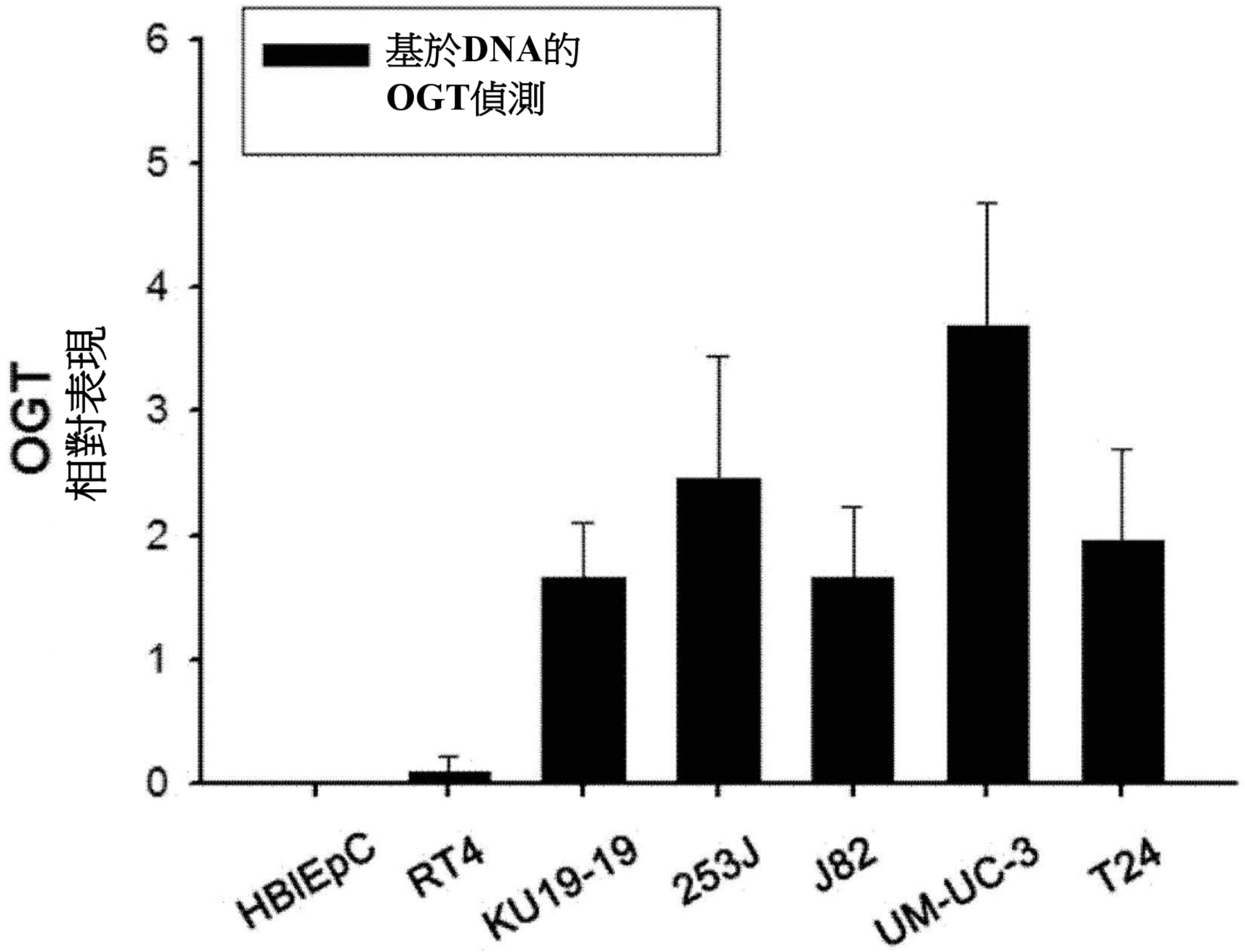


【圖103】

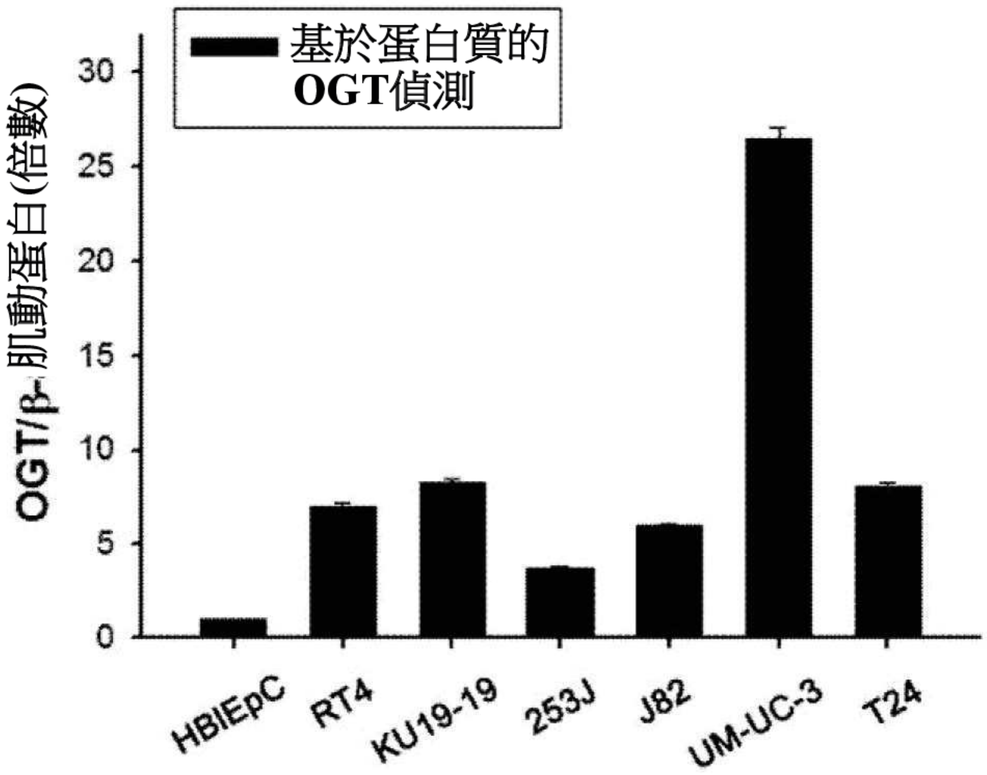


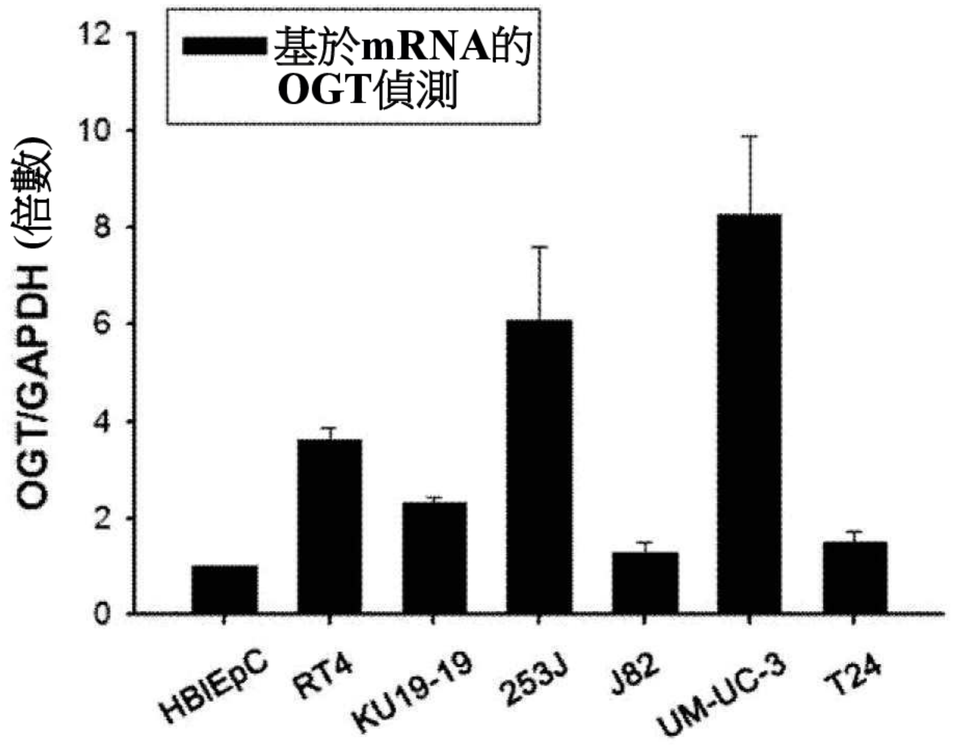
結果	UM UC 3	KU 19-19	253J	J82	T24	RT4	HBL EpC
OD	0.092±0.033	0.042±0.011	0.061±0.035	0.042±0.014	0.049±0.019	0.002±0.003	0.00±0.00

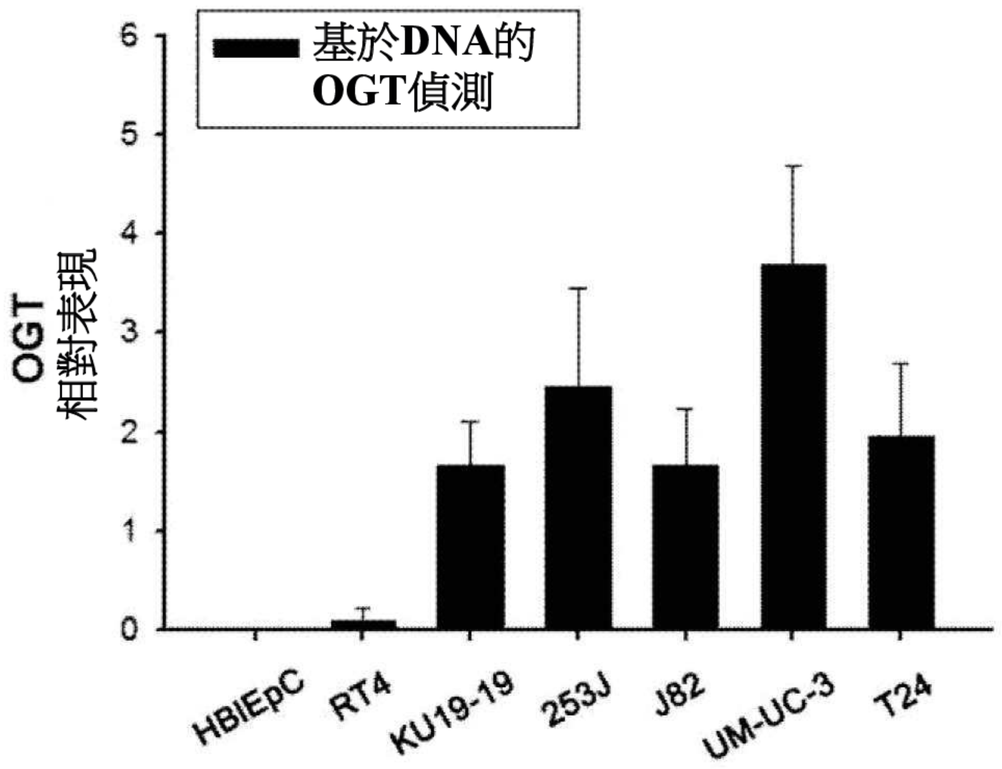
【圖104】


基於DNA的
OGT偵測
OGT
相對表現
0
1
2
3
4
5
6
HBlEpC
RT4
KU19-19
253J
J82
UM-UC-3
T24

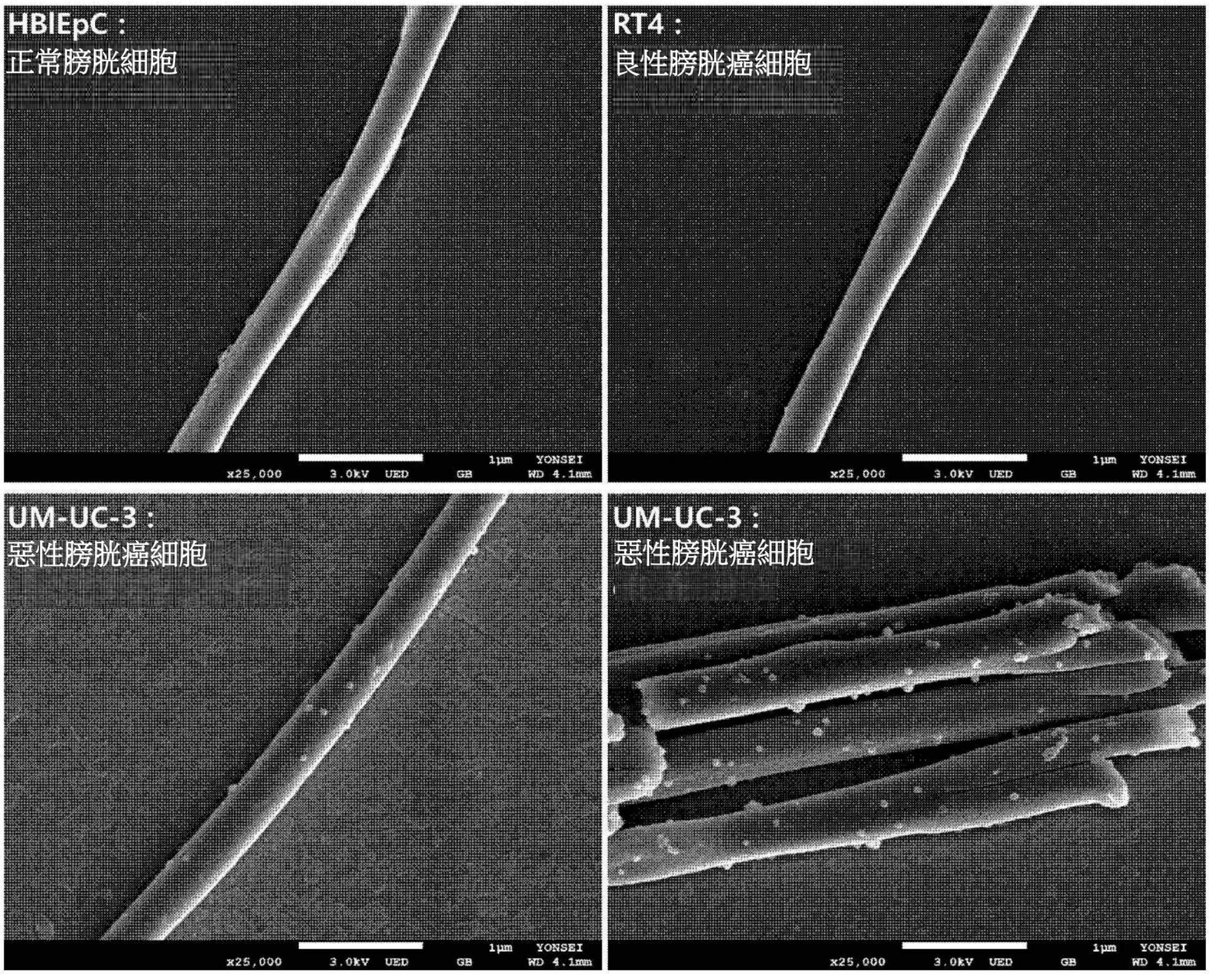
【圖105】


基於蛋白質的
OGT偵測
OGT/β-肌動蛋白(倍數)
30
25
20
15
10
5
0
HBlEpC
RT4
KU19-19
253J
J82
UM-UC-3
T24

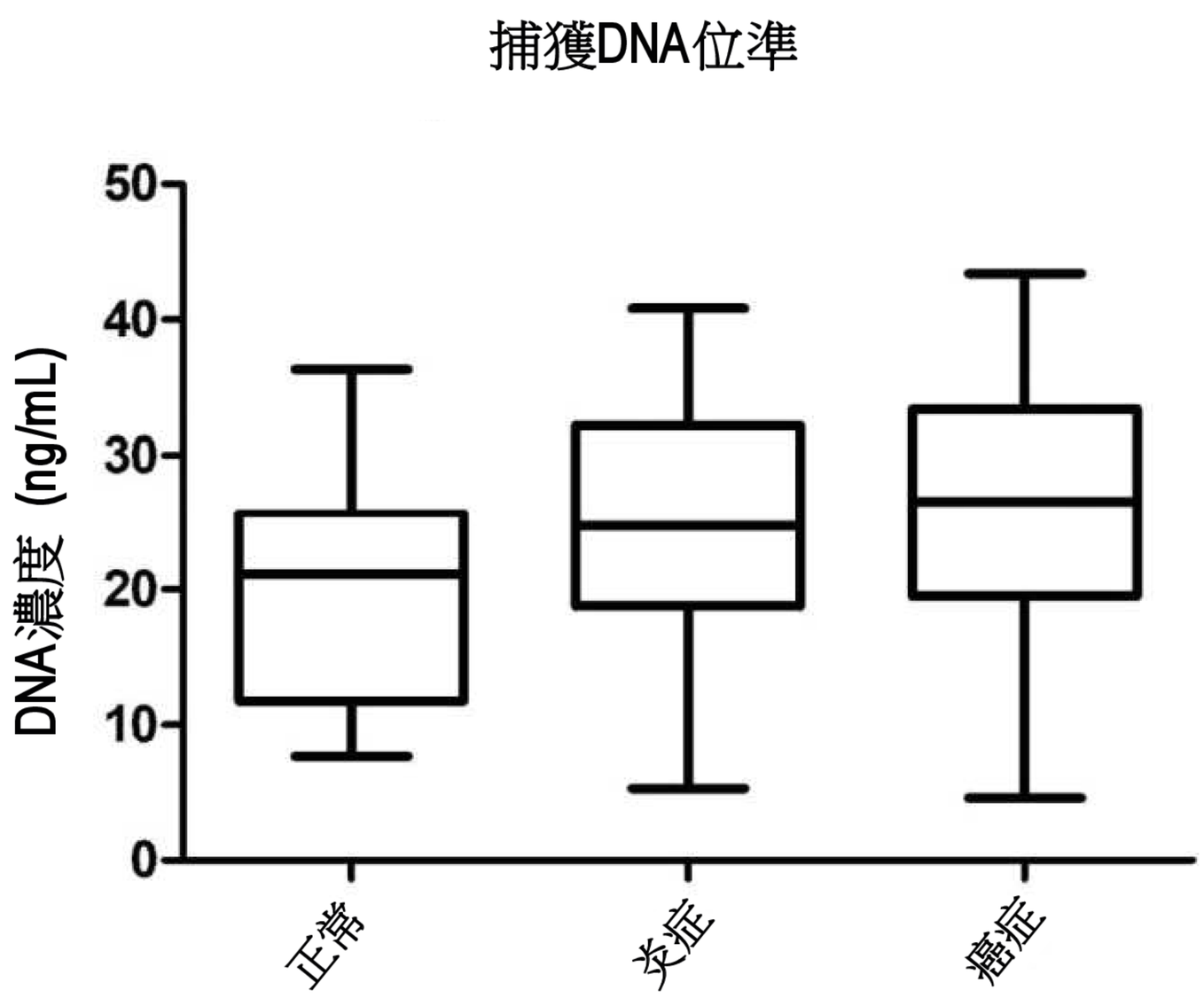

基於mRNA的
OGT偵測
OGT/GAPDH (倍數)
12
10
8
6
4
2
0
HBlEpC
RT4
KU19-19
253J
J82
UM-UC-3
T24


基於DNA的
OGT偵測
OGT
相對表現
6
5
4
3
2
1
0
HBlEpC
RT4
KU19-19
253J
J82
UM-UC-3
T24

【圖106】

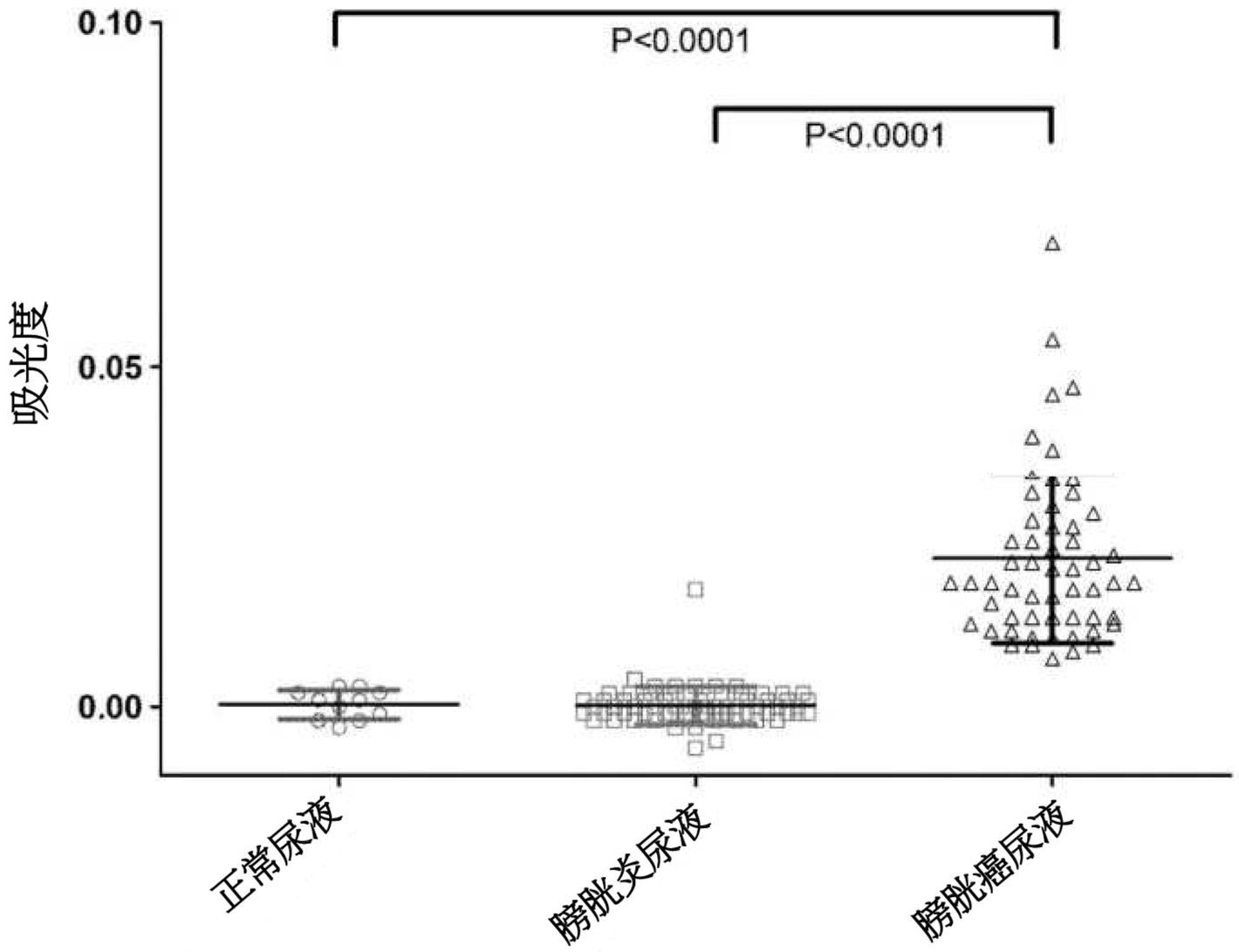

HBlEpC：
正常膀胱細胞
RT4：
良性膀胱癌細胞
UM-UC-3：
惡性膀胱癌細胞
UM-UC-3：
惡性膀胱癌細胞
x25,000 3.0kV UED GB 1μm YONSEI WD 4.1mm

【圖107】

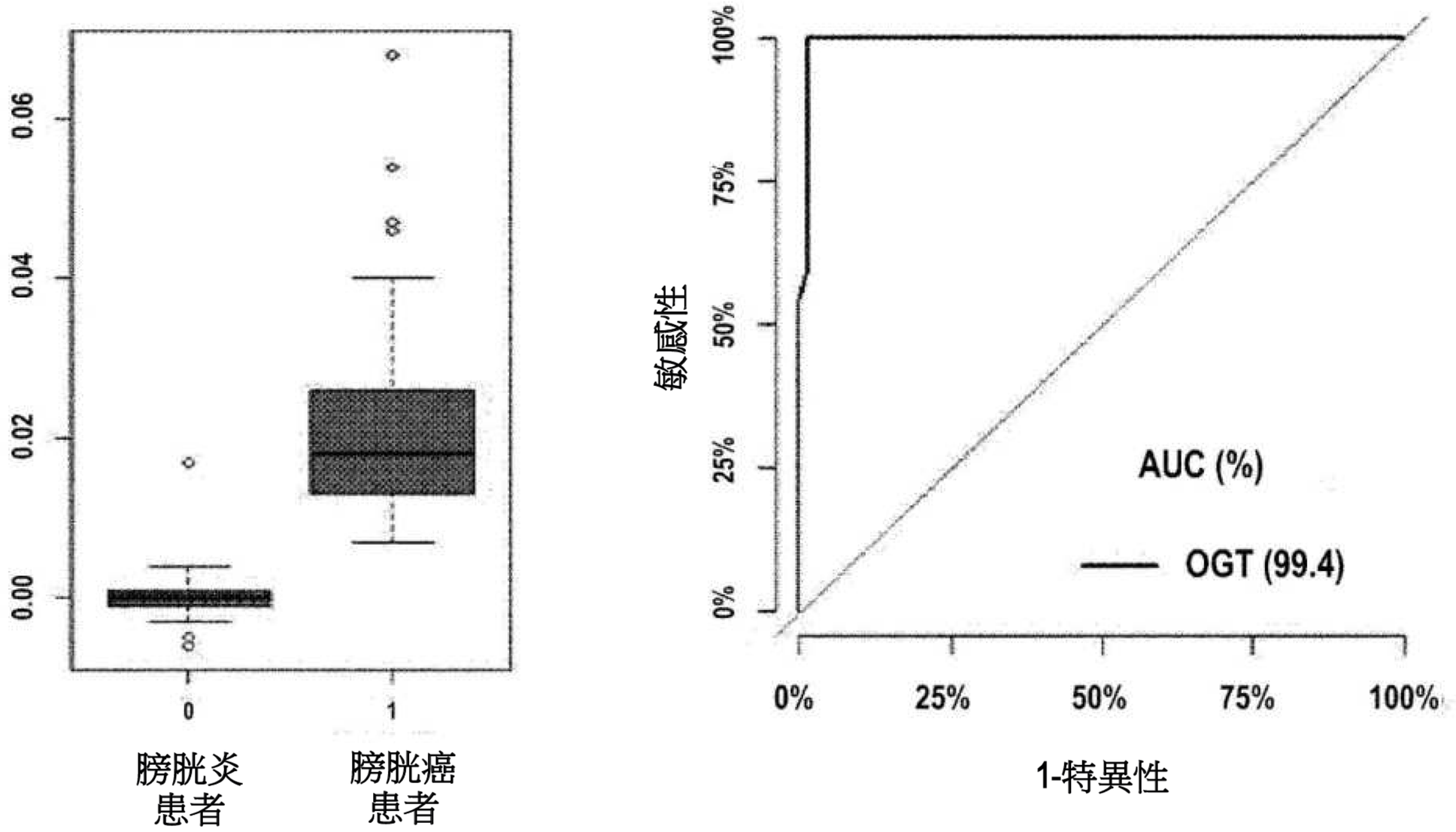


	正常	炎症	癌症
N	17	78	79

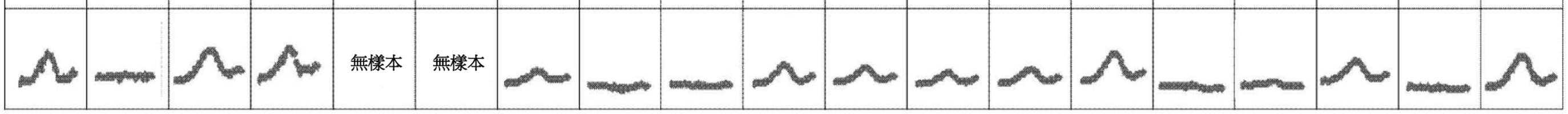
【圖108】

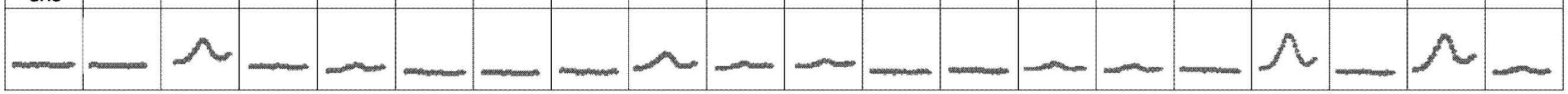

0.10
0.05
0.00
吸光度
P<0.0001
P<0.0001
正常尿液
膀胱炎尿液
膀胱癌尿液

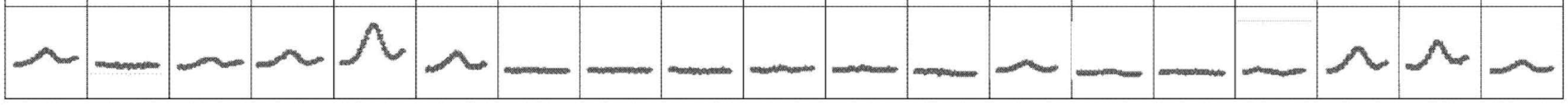
【圖109】


0.06
0.04
0.02
0.00
0
1
膀胱炎
患者
膀胱癌
患者
100%
75%
50%
25%
0%
敏感性
AUC (%)
OGT (99.4)
0%
25%
50%
75%
100%
1-特異性

【圖110】

OGT-001	OGT-002	OGT-003	OGT-004	OGT-005	OGT-006	OGT-007	OGT-008	OGT-009	OGT-010	OGT-012	OGT-013	OGT-014	OGT-015	OGT-016	OGT-017	OGT-018	OGT-019	OGT-020
膀胱癌	OAB / GHU	膀胱癌	膀胱癌	BPH	Lt 膀胱癌	輸尿管癌	BPH	腎結石，Rt	排尿問題/mHU /卵巢癌	腎結石/乳癌	BPH / 前列腺癌	膀胱癌	GHU 子宮頸癌	GHU 膀胱炎	夜尿性膀胱炎	OAB, BPH / 喉癌	GHU 膀胱炎	GHU / 子宮頸癌
																		

OGT-021	OGT-022	OGT-023	OGT-024	OGT-025	OGT-026	OGT-027	OGT-028	OGT-029	OGT-030	OGT-031	OGT-032	OGT-033	OGT-034	OGT-035	OGT-036	OGT-037	OGT-038	OGT-039	OGT-040
BPH 腎盂旁囊腫, LT GHU	GHU BPO 帶有高膀胱頸	膀胱癌	BPH	mHU / 乳癌	GHU / 夜尿症	膀胱炎	GHU	膀胱癌/輸尿管癌	mHU	GHU / 直腸癌	腎結石 mHU	mHU	GHU / 乳癌	GHU / 直腸癌	mHU / 胃癌	膀胱癌	mHU / 腎囊腫(最大3 cm 尺寸)	膀胱癌	mHU
																			

OGT-041	OGT-042	OGT-043	OGT-044	OGT-045	OGT-046	OGT-047	OGT-048	OGT-050	OGT-051	OGT-052	OGT-053	OGT-054	OGT-055	OGT-056	OGT-057	OGT-058	OGT-059	OGT-060
GHU / 子宮頸癌	mHU / BPH	膀胱癌	膀胱癌	膀胱癌	GHU / 前列腺癌	BPH	Lt renal cyst BPH	膀胱炎/肝細胞癌的惡性腫瘤	GHU	GHU	mHU	膀胱腫塊	mHU	GHU	GHU	GHU / 子宮頸癌	膀胱癌	膀胱癌 Lt輸尿管癌
																		

GHU：肉眼血尿
OAB：膀胱過動症
BPH：良性前列腺增生
mHU：鏡下血尿
Cystitis：膀胱炎症

【圖111】

OGT-061	OGT-062	OGT-063	OGT-064	~~OGT-065~~	OGT-066	OGT-067	OGT-068	OGT-069	OGT-070	OGT-071	OGT-072	OGT-073	OGT-074	OGT-075	OGT-076	OGT-077	OGT-078	OGT-079	OGT-080
mHU/大腸癌	膀胱癌	Rt輸尿管結石, L4級	膀胱癌	輸尿管癌, ~~Lt~~ 膀胱癌	GHU/BPH	mHU/卵巢癌	膀胱癌/前列腺癌	膀胱癌	GHU	mHU/乳癌	GHU	mHU/乳癌	GHU	mHU/乳癌	mHU/子宮頸癌	膀胱癌	GHU/HCC	mHU	BPH
				無樣本															

OGT-081	OGT-082	OGT-083	OGT-084	OGT-085	OGT-086	OGT-087	OGT-088	OGT-089	OGT-090	OGT-091	OGT-092	OGT-093	OGT-094	OGT-095	OGT-096	OGT-097	OGT-098	OGT-099	OGT-100
膀胱癌	膀胱癌	膀胱癌	膀胱癌	輸尿管癌/移行細胞癌(泌尿道上皮細胞癌)	GHU/子宮頸癌	膀胱癌	mHU	GHU/子宮頸癌	GHU/直腸癌	GHU	GHU/子宮頸癌/膀胱受侵	GHU	膀胱癌	GHU	膀胱癌	GHU/前列腺癌	mHU	mHU	mHU

OGT-101	OGT-102	OGT-103	OGT-104	OGT-105	OGT-106	OGT-107	OGT-108	OGT-109	OGT-110	OGT-111	OGT-112	OGT-113	OGT-114	OGT-115	OGT-116	OGT-117	OGT-118	OGT-119	OGT-120
GHU, 輸尿管結石	mHU/膀胱炎	mHU/子宮頸癌/膀胱受侵	MHU	膀胱癌	膀胱腫塊(平滑肌瘤)	膀胱癌	膀胱癌	膀胱癌	膀胱癌	膀胱癌	膀胱癌	mHU	mHU	膀胱癌	膀胱癌	GHU/子宮頸癌/無膀胱受侵/RT膀胱炎 mHU	mHU/膀胱炎/rec	mHU	mHU/膀胱炎

GHU：肉眼血尿
BPH：良性前列腺增生
mHU：鏡下血尿
Cystitis：膀胱炎症
HCC: 肝細胞癌

【圖112】

OGT-121	OGT-122	OGT-123	OGT-124	OGT-125	OGT-126	OGT-127	OGT-128	OGT-129	OGT-130	OGT-131	OGT-132	OGT-133	OGT-134	OGT-135	OGT-136	OGT-137	OGT-138	OGT-139	OGT-140
GHU	GHU	mHU	GHU	膀胱癌	膀胱癌	GHU	mHU	mHU	mHU	mHU / 腎細胞癌	膀胱癌	膀胱癌	mHU	膀胱癌	膀胱癌	TCC 膀胱癌	膀胱癌	GHU	膀胱癌
			無樣本												無樣本				無樣本

OGT-141	OGT-142	OGT-143	OGT-144	OGT-145	OGT-146	OGT-147	OGT-148	OGT-149	OGT-150	OGT-151	OGT-152	OGT-153	OGT-154	OGT-155	OGT-156	OGT-157	OGT-158	~~OGT-159~~	OGT-160
mHU	mHU	mHU	膀胱癌	GHU / 乳癌	膀胱癌	膀胱癌	mHU	GHU / 惡性類癌腫瘤直腸	mHU	膀胱癌	膀胱癌	膀胱癌	膀胱癌	mHU / 乳癌/沒有膀胱受侵	GHU / 神經內分泌癌(肝)	Lt腎盂腫瘤	GHU / 肺癌	~~N.~~膀胱~~-~~/胃癌	膀胱癌/肺癌
		無樣本											無樣本					無樣本	

OGT-161	OGT-162	OGT-163	OGT-164	~~OGT-165~~	OGT-166	OGT-167	OGT-168	OGT-169	OGT-170	OGT-171	OGT-172	OGT-173	OGT-174	OGT-175	OGT-176	OGT-177	OGT-178	OGT-179
GHU	膀胱癌	膀胱炎	GHU	~~MHU~~	膀胱癌	膀胱癌	MHU / 肺癌	膀胱癌	腎結石	mHU /子宮頸癌/沒有膀胱受侵/由於歸因於Rtx之遠端輸尿管口孔狹窄所致之兩HUN的RT膀胱炎	膀胱炎/子宮頸癌/沒有膀胱受侵/膀胱兩側側壁的Rtx膀胱炎	GHU / 尿道炎	GHU / 子宮頸癌/SCC併有膀胱癌侵犯	mHU	mHU, 前列腺炎	膀胱癌(腺癌)	膀胱癌	膀胱癌
				無樣本														

GHU : 肉眼血尿
mHU : 鏡下血尿
Cystitis : 膀胱炎症

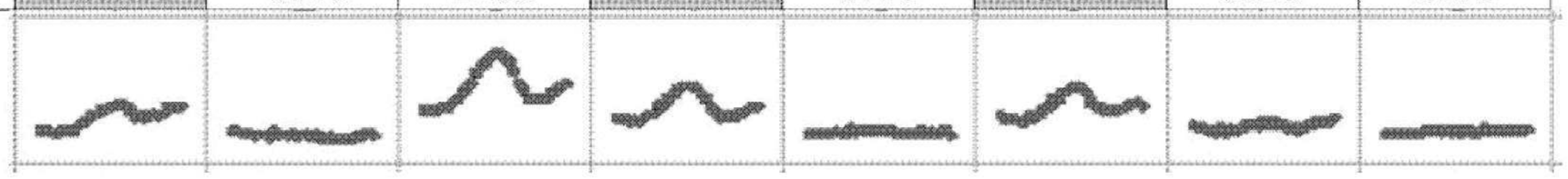
【圖113】

甲狀腺癌患者#1

組織：**BRAF V600E** 陽性

TC#1

波長	BRAF V600E	TERT C228T	TERT C250T	BRAF V600E	TERT C228T	TERT C250T	PC	NC
500	0.043	0.043	0.05	0.048	0.042	0.049	0.045	0.042
650	0.052	0.042	0.07	0.059	0.043	0.058	0.047	0.043
	0.009	-0.001	0.02	0.011	0.001	0.009	0.002	0.001
	0.90	-0.10	2.00	1.10	0.10	0.90	0.20	0.10

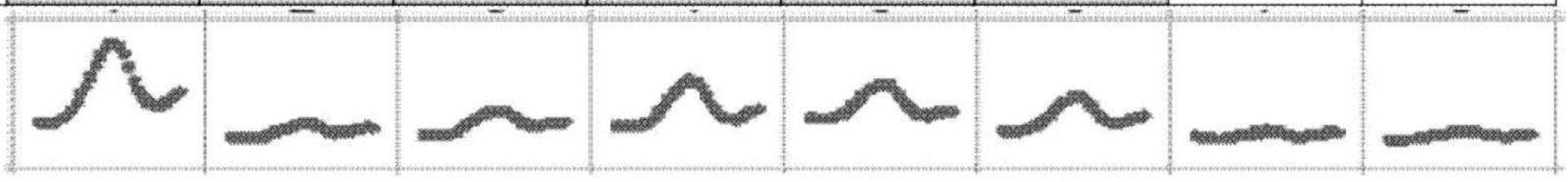


【圖114】

甲狀腺癌患者#2

組織：**BRAF V600E** 陽性

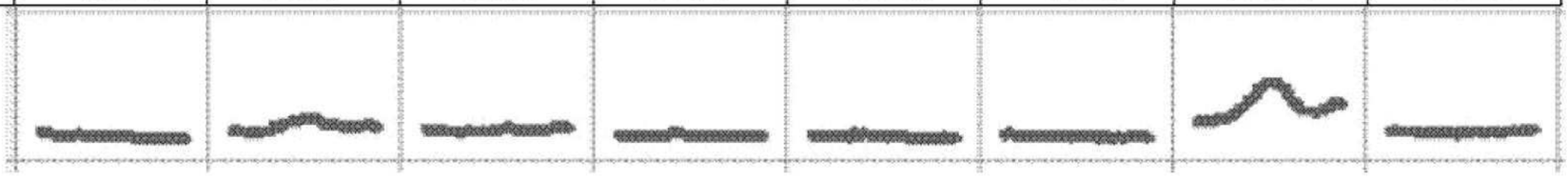
波長	BRAF V600E	TERT C228T	TERT C250T	BRAF V600E	TERT C228T	TERT C250T	PC	NC
500	0.055	0.046	0.047	0.052	0.059	0.05	0.046	0.043
650	0.11	0.054	0.064	0.085	0.082	0.073	0.05	0.05
	0.055	0.008	0.017	0.033	0.023	0.023	0.004	0.007
	5.50	0.80	1.70	3.30	2.30	2.30	0.40	0.70



【圖115】

甲狀腺癌患者#3

組織：BRAF V600E 陰性

波長	BRAF V600E	TERT C228T	TERT C250T	BRAF V600E	TERT C228T	TERT C250T	PC	NC
500	0.043	0.045	0.045	0.042	0.042	0.042	0.05	0.044
650	0.041	0.052	0.045	0.042	0.04	0.04	0.078	0.042
	-0.002	0.007	0	0	-0.002	-0.002	0.028	-0.002
	-0.20	0.70	0.00	0.00	-0.20	-0.20	2.80	-0.20
								

【圖116】

0208-668 (LC#4, 積液)

組織：SCLC患者

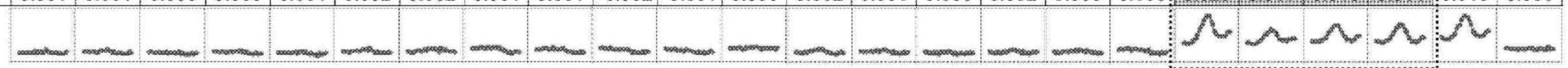
請求：全部SCLC

SCLC標記：突觸蛋白(SYP)/嗜鉻粒蛋白(CgA)/CD56 (NCAM1)/甲狀腺轉錄因子1(NKX2-1)

波長	G719X	E19del	E20ins	S768I	T790M	C797S	L858R	L861Q	RET	ROS	ALK 融合	ALK 突變	c-MET	c-MET 14 跳躍	PD-L1	KRAS	BRAF	FGFR	SYP	CgA	NCAM1	NKX2-1	PC	NC
500	0.041	0.04	0.04	0.04	0.042	0.042	0.041	0.04	0.042	0.043	0.043	0.042	0.04	0.04	0.04	0.04	0.044	0.043	0.045	0.045	0.047	0.046	0.05	0.043
650	0.044	0.042	0.041	0.042	0.043	0.044	0.043	0.044	0.046	0.044	0.042	0.045	0.042	0.042	0.042	0.04	0.049	0.043	0.062	0.063	0.062	0.06	0.077	0.043
O.D	0.003	0.002	0.001	0.002	0.001	0.002	0.002	0.004	0.004	0.001	-0.001	0.003	0.002	0.002	0.002	0.000	0.005	0.000	0.017	0.018	0.015	0.014	0.027	0.000



波長	G719X	E19del	E20ins	S768I	T790M	C797S	L858R	L861Q	RET	ROS	ALK 融合	ALK 點突變	c-MET	c-MET 14 跳躍	PD-L1	KRAS	BRAF	FGFR	SYP	CgA	NCAM1	NKX2-1	PC	NC
500	0.039	0.041	0.04	0.041	0.04	0.041	0.041	0.043	0.042	0.044	0.043	0.044	0.041	0.041	0.041	0.041	0.041	0.043	0.048	0.049	0.05	0.05	0.053	0.044
650	0.04	0.042	0.04	0.041	0.041	0.043	0.043	0.044	0.043	0.042	0.042	0.044	0.043	0.042	0.041	0.043	0.041	0.043	0.071	0.06	0.063	0.064	0.071	0.044
O.D	0.001	0.001	0.000	0.000	0.001	0.002	0.002	0.001	0.001	-0.002	-0.001	0.000	0.002	0.001	0.000	0.002	0.000	0.000	0.023	0.011	0.013	0.014	0.018	0.000



【圖117】

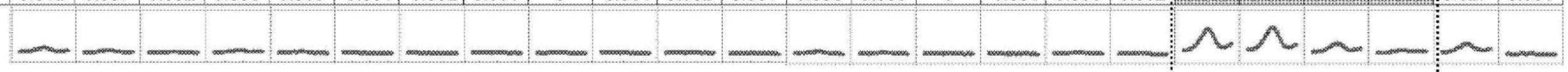
2019-08-16 0208-674 (LC#3, 血液, 尿液, 唾液, 痰)

組織：野生型/診斷為SCLC (2019.8)/ 抗癌妥-順鉑(Irinotecan-cisplatin) (2019.8.29)

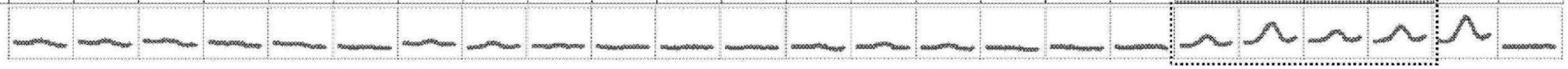
請求：全部

SCLC標記：突觸蛋白(SYP)/嗜鉻粒蛋白(CgA)/CD56 (NCAM1)/甲狀腺轉錄因子1(NKX2-1)

波長	G719X	外顯子19del	外顯子20ins	S768I	T790M	C797S	L858R	L861Q	RET	ROS	ALK融合var.1	ALK融合var.3	ALK突變	c-MET	c-MET外顯子14跳躍	PD-L1	KRAS	BRAF V600E	SYP	CgA	NCAM1	NKX	PC	NC
500	0.042	0.04	0.039	0.04	0.039	0.039	0.04	0.039	0.039	0.04	0.038	0.037	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.039	0.05	0.051	0.044	0.041	0.043	0.038
650	0.054	0.047	0.041	0.045	0.042	0.038	0.038	0.04	0.039	0.039	0.04	0.038	0.046	0.043	0.04	0.039	0.043	0.041	0.113	0.116	0.069	0.05	0.07	0.039
O.D	0.012	0.007	0.002	0.005	0.003	-0.001	-0.002	0.001	0	-0.001	0.002	0.001	0.006	0.003	0	-0.001	0.003	0.002	0.063	0.065	0.025	0.009	0.027	0.001



波長	G719X	外顯子19del	外顯子20ins	S768I	T790M	C797S	L858R	L861Q	RET	ROS	ALK融合var.1	ALK融合var.3	ALK突變	c-MET	c-MET外顯子14跳躍	PD-L1	KRAS	BRAF V600E	SYP	CgA	NCAM-1	NKX2-1	PC	NC
500	0.05	0.051	0.053	0.051	0.048	0.044	0.048	0.042	0.045	0.044	0.043	0.042	0.043	0.043	0.042	0.042	0.043	0.043	0.045	0.05	0.052	0.051	0.052	0.043
650	0.053	0.053	0.053	0.049	0.048	0.043	0.053	0.05	0.047	0.042	0.044	0.043	0.046	0.048	0.046	0.041	0.041	0.043	0.059	0.078	0.067	0.074	0.09	0.044
OD	0.003	0.002	0	-0.002	0	-0.001	0.005	0.008	0.002	-0.002	0.001	0.001	0.003	0.005	0.004	-0.001	-0.002	0	0.014	0.028	0.015	0.023	0.038	0.001



【圖118】

2019-08-28 0208-685 (LC#2, 血液)

組織：SCLC

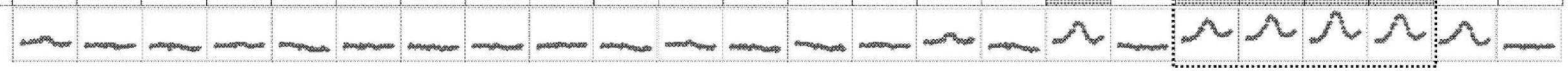
請求：全部/SCLC

SCLC標記：突觸蛋白(SYP)/嗜鉻粒蛋白(CgA)/CD56 (NCAM1)/甲狀腺轉錄因子1(NKX2-1)

波長	G719X	外顯子19del	外顯子20ins	S768I	T790M	C797S	L858R	L861Q	RET	ROS	ALK融合var.1	ALK融合var.3	ALK突變	c-MET	c-MET外顯子14跳躍	PD-L1	KRAS	BRAF V600E	SYP	CgA	NCAM1	NKX2-1	PC	NC
500	0.038	0.038	0.04	0.039	0.04	0.039	0.041	0.039	0.04	0.039	0.039	0.038	0.041	0.04	0.041	0.038	0.047	0.035	0.045	0.043	0.042	0.045	0.044	0.04
650	0.04	0.038	0.04	0.043	0.04	0.04	0.042	0.041	0.043	0.041	0.044	0.041	0.041	0.039	0.053	0.043	0.078	0.034	0.07	0.053	0.057	0.086	0.065	0.04
O.D	0.002	0	0	0.004	0	0.001	0.001	0.002	0.003	0.002	0.005	0.003	0	-0.001	0.012	0.005	0.031	-0.001	0.025	0.01	0.015	0.041	0.021	0



波長	G719X	外顯子19 del	外顯子20 ins	S768I	T790M	C797S	L858R	L861Q	RET	ROS	ALK融合var.1	ALK融合var.3	ALK突變	c-MET	c-MET外顯子14跳躍	PD-L1	KRAS	BRAF V600E	SYP	CgA	NCAM-1	NKX2-1	PC	NC
500	0.04	0.038	0.038	0.038	0.039	0.038	0.038	0.038	0.037	0.038	0.04	0.038	0.041	0.039	0.041	0.038	0.041	0.039	0.043	0.044	0.042	0.042	0.041	0.038
650	0.044	0.04	0.038	0.04	0.038	0.039	0.039	0.039	0.04	0.039	0.042	0.038	0.039	0.04	0.047	0.04	0.057	0.038	0.058	0.061	0.064	0.062	0.056	0.038
OD	0.004	0.002	0	0.002	-0.001	0.001	0.001	0.001	0.003	0.001	0.002	0	-0.002	0.001	0.006	0.002	0.016	-0.001	0.015	0.017	0.022	0.02	0.015	0



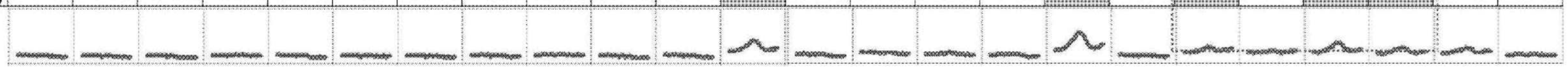
【圖119】

2019-08-16 0208-665 (LC#5, 血液, 積液), 復發患者

組織：野生型/ALK融合(FISH)/
小細胞肺癌(SCLC) (經韓國癌症中心醫院診斷)/經開立截剋瘤但無治療效果

SCLC標記：突觸蛋白(SYP)/嗜鉻粒蛋白(CgA)/CD56 (NCAM1)/甲狀腺轉錄因子1(NKX2-1)

波長	G719X	外顯子19del	外顯子20ins	S768I	T790M	C797S	L858R	L861Q	RET	ROS	ALK融合var.1	ALK融合var.3	ALK突變	c-MET	c-MET外顯子14跳躍	PD-L1	KRAS	BRAF V600E	SYP	CgA	NCAM1	NKX2-1	PC	NC
500	0.039	0.038	0.037	0.038	0.04	0.038	0.038	0.039	0.038	0.038	0.04	0.046	0.04	0.045	0.041	0.039	0.048	0.04	0.043	0.044	0.045	0.042	0.042	0.038
650	0.039	0.039	0.038	0.04	0.039	0.039	0.039	0.04	0.041	0.038	0.039	0.066	0.04	0.043	0.044	0.041	0.081	0.038	0.054	0.046	0.062	0.052	0.052	0.04
OD	0	0.001	0.001	0.002	-0.001	0.001	0.001	0.001	0.003	0.000	-0.001	0.020	0.000	-0.002	0.003	0.002	0.033	-0.002	0.011	0.002	0.017	0.01	0.01	0.002
N- 計分 (O.D/0.01)	0.00	0.10	0.10	0.20	-0.10	0.10	0.10	0.10	0.30	0.00	-0.10	2.00	0.00	-0.20	0.30	0.20	3.30	-0.20	1.10	0.20	1.70	1.00	1.00	0.20



【圖120】

2019-10-04 0208-700 (LC#4, 血液), 復發患者

組織：SCLC

請求：全部

SCLC標記：突觸蛋白(SYP)/嗜鉻粒蛋白(CgA)/CD56 (NCAM1)/甲狀腺轉錄因子1(NKX2-1)

波長	G719X	外顯子19del	外顯子20ins	S768I	T790M	C797S	L858R	L861Q	RET	ROS	ALK融合var.1	ALK融合var.3	ALK突變	c-MET	c-MET外顯子14跳躍	PD_L1	KRAS	BRAF V600E	SYP	CgA	NCAM1	NKX2-1	PC	NC
500	0.041	0.039	0.04	0.04	0.04	0.041	0.039	0.038	0.039	0.04	0.038	0.038	0.039	0.039	0.039	0.049	0.038	0.039	0.042	0.049	0.044	0.051	0.046	0.04
650	0.043	0.04	0.039	0.039	0.042	0.05	0.04	0.04	0.041	0.043	0.036	0.039	0.039	0.039	0.041	0.097	0.039	0.045	0.058	0.083	0.068	0.115	0.075	0.04
OD	0.002	0.001	-0.001	-0.001	0.002	0.009	0.001	0.002	0.002	0.003	-0.002	0.001	0.000	0.000	0.002	0.048	0.001	0.006	0.016	0.034	0.024	0.064	0.029	0
N- 計分 (O.D/0.01)	0.20	0.10	-0.10	-0.10	0.20	0.90	0.10	0.20	0.20	0.30	-0.20	0.10	0.00	0.00	0.20	4.80	0.10	0.60	1.60	3.40	2.40	6.40	2.90	0.00

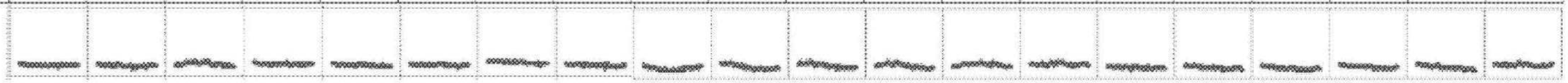


【圖121】

SCLC標記：突觸蛋白(SYP)/嗜鉻粒蛋白(CgA)/CD56 (NCAM1)/甲狀腺轉錄因子1(NKX2-1)

檢測#1

樣本	20190802 LC#4 血液				20190805 LC#1 血液				20190808 LC#1 血液				20190809 LC#2 血液				20190809 LC#3 血液			
波長	SYP	CgA	NCAM1	NKX2-1	SYP	CgA	NCAM1	NKX2-1	SYP	CgA	NCAM1	NKX2-1	SYP	CgA	NCAM1	NKX2-1	SYP	CgA	NCAM1	NKX2-1
500	0.041	0.04	0.04	0.042	0.041	0.041	0.042	0.04	0.04	0.042	0.042	0.04	0.04	0.042	0.04	0.04	0.04	0.041	0.041	0.041
650	0.039	0.039	0.042	0.041	0.04	0.04	0.041	0.04	0.037	0.039	0.041	0.04	0.042	0.043	0.04	0.04	0.039	0.04	0.039	0.041
OD	-0.002	-0.001	0.002	-0.001	-0.001	-0.001	-0.001	0.000	-0.003	-0.003	-0.001	0.000	0.002	0.001	0.000	0.000	-0.001	-0.001	-0.002	0.000



檢測#2

樣本	20190802 LC#4 血液				20190805 LC#1 血液				20190808 LC#1 血液				20190809 LC#2 血液				20190809 LC#3 血液			
波長	SYP	CgA	NCAM1	NKX2-1	SYP	CgA	NCAM1	NKX2-1	SYP	CgA	NCAM1	NKX2-1	SYP	CgA	NCAM1	NKX2-1	SYP	CgA	NCAM1	NKX2-1
500	0.04	0.04	0.04	0.042	0.042	0.042	0.041	0.041	0.041	0.043	0.042	0.042	0.041	0.043	0.04	0.041	0.043	0.042	0.04	0.04
650	0.04	0.041	0.042	0.043	0.043	0.043	0.039	0.043	0.04	0.041	0.042	0.043	0.041	0.042	0.042	0.041	0.045	0.043	0.039	0.04
O.D	0.000	0.001	0.002	0.001	0.001	0.001	-0.002	0.002	-0.001	-0.002	0.000	0.001	0.000	-0.001	0.002	0.000	0.002	0.001	-0.001	0.000



【圖122】

➢ 肺癌

位點	腫瘤標記	樣本類型
支氣管/肺	NSE	血清
	SCC	血清
	CEA	血清
	Cyfra 21-1	血清
	TPA	血清

分組	NSE（ng/mL）		CEA (ng/mL)	
	平均	Sd	平均	Sd
NSCLC (n=36)	32.0	16.7	51.6	68.3
BLD (n=32)	15.1	10.9	4.9	3.1

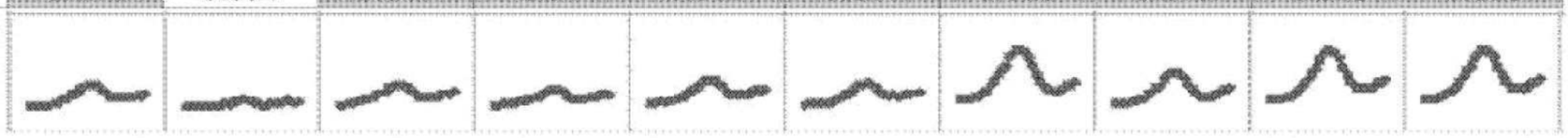
NSCLC:非小細胞肺癌; BLD: 良性肺病; SD: 標準偏差

	CEA 位準 (< 5.0 正常)	個體編號	階段	T	N	M	採樣日期	樣本收集時間	患者狀態	Qt
0185-008(33172242,LC#3)	2	0185-008	3A	1	2	0	2018-07-11	PD期間	CCRT隨後PD	
0185-009(33315258, LC#1	3.2	0185-009	3A	2b	2	0	2018-01-22	CCRT結束後	CCRT隨後PD	
0185-009(33315258, LC#1)	1.8	0185-009	複製				2018-12-18	PD期間	PD	
0185-011(33206191, LC#1)	2.4	0185-011	1B	2a	0	0	2018-01-02	OP結束後	NED	
0185-013(33318303, LC#1)	5.4	0185-013	1A3	1c	0	0	2018-01-03	OP結束後	NED	
0185-014(33320070, LC#4)	1.5	0185-014	3A	3	1	0	2018-01-10	OP前	因手術後發現另一種癌症而退出	
0185-014(33320070, LC#1)	1.5	0185-014	複製				2018-02-13	OP結束後		
0185-015(33321414, LC#4)	0.7	0185-015	1B	2a	0	0	2018-01-17	OP結束後	撤回同意	
0185-016(33318406, LC#1)	2.4	0185-016	2B	3	0	0	2018-02-12	OP結束後/ CTx調整前	Adj. CTx隨後PD	
0185-016(33318406, LC#1)	1.8	0185-016	複製				2018-05-21	CTx調整結束後	PD	
0185-016(33318406, LC#1)	2.3	0185-016	複製				2018-12-17	PD期間	PD	
0185-017(33319768, LC#6)	7.7	0185-017	3B	3	2	0	2018-02-23	OP結束後/ CTx調整前	NED	
0185-017 (33319768, LC#1)	3	0185-017	複製				2018-06-04	CTx調整結束後	PD	
0185-018(33325866, LC#1)	5.6	0185-018	3B	3	2	0	2018-04-03	CCRT前	CCRT隨後FU	
0185-018(33325866, LC#3)	2.7	0185-018	複製				2018-06-07	CCRT結束後	PD	
0185-019(33328233, LC#2)	13.8	0185-019	3B	3	2	0	2018-05-15	CCR前	CCRT隨後FU	
0185-019(33328233)	6.6	0185-019	複製					CCRT結束後	PD	

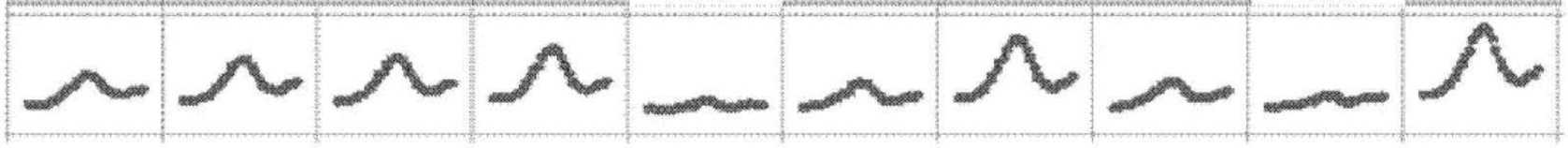
【圖123】

➢ 肺癌

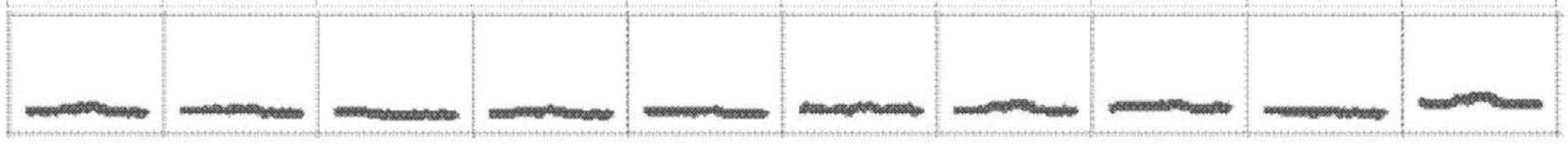
20180813 LC#3

WAV.	NSE, 27	NSE, 95	SCC, 27	SCC, 95	CEA, 27	CEA, 95	Cyfra21-1, 27	Cyfra21-1, 95	TPA, 27	TPA, 95
500	0.041	0.041	0.042	0.041	0.043	0.042	0.045	0.042	0.045	0.045
650	0.053	0.045	0.053	0.051	0.056	0.053	0.074	0.06	0.073	0.074
	0.012	0.004	0.011	0.01	0.013	0.011	0.029	0.018	0.028	0.029
										

20180817 LC#3

NSE, 27	NSE, 95	SCC, 27	SCC, 95	CEA, 27	CEA, 95	Cyfra21-1, 27	Cyfra21-1, 95	TPA, 27	TPA, 95
0.043	0.045	0.044	0.046	0.04	0.041	0.046	0.041	0.041	0.048
0.06	0.068	0.069	0.074	0.045	0.055	0.08	0.056	0.048	0.086
0.017	0.023	0.025	0.028	0.005	0.014	0.034	0.015	0.007	0.038
									

正常

NSE, 27	NSE, 95	SCC, 27	SCC, 95	CEA, 27	CEA, 95	Cyfra21-1, 27	Cyfra21-1, 95	TPA, 27	TPA, 95
0.039	0.039	0.038	0.037	0.039	0.04	0.039	0.04	0.039	0.043
0.04	0.04	0.036	0.04	0.039	0.041	0.042	0.042	0.039	0.047
0.001	0.001	-0.002	0.003	0	0.001	0.003	0.002	0	0.004
									

截止 > 0.01

【圖124】

0208-009 (血液)

0185-009	0185-009 (手術前)					0185-009 (手術後)					PC	NC
波長	NSE	SCC	CEA	Cyfra21-1	TPA	NSE	SCC	CEA	Cyfra21-1	TPA		
500	0.043	0.042	0.043	0.042	0.042	0.044	0.046	0.043	0.045	0.041	0.048	0.039
650	0.051	0.05	0.055	0.048	0.052	0.058	0.06	0.06	0.06	0.044	0.074	0.041
O.D	0.008	0.008	0.012	0.006	0.01	0.014	0.014	0.017	0.015	0.003	0.026	0.002
N- 計分	0.80	0.80	1.20	0.60	1.00	1.40	1.40	1.70	1.50	0.30	2.60	0.20

0208-009 臨床資訊

	CEA 位準(< 5.0 正常)	個體編號	階段	T	N	M	樣本日期	採樣時間	患者狀態
0185-009 (33315258, LC#1	3.2	0185-009	3A	2b	2	0	2018-01-22	CCRT結束後	CCRT隨後PD
0185-009 (33315258, LC#1)	1.8	0185-009	複製				2018-12-18	PD期間	PD

【圖125】

0208-017 (血液)

0185-017	0185-017 (手術前)					0185-017 (手術後)					PC	NC
波長	NSE	SCC	CEA	Cyfra21-1	TPA	NSE	SCC	CEA	Cyfra21-1	TPA		
500	0.044	0.043	0.043	0.043	0.045	0.045	0.044	0.043	0.044	0.048	0.051	0.043
650	0.053	0.049	0.053	0.05	0.056	0.05	0.05	0.049	0.048	0.065	0.075	0.043
O.D	0.009	0.006	0.01	0.007	0.011	0.005	0.006	0.006	0.004	0.017	0.024	0
N- 計分	0.90	0.60	1.00	0.70	1.10	0.50	0.60	0.60	0.40	1.70	2.40	0.00

0208-017 臨床資訊

	CEA 位準 (< 5.0 正常)	個體編號	階段	T	N	M	樣本日期	採樣時間	患者狀態
0185-017(33319768, LC#6)	7.7	0185-017	3B	3	2	0	2018-02-23	OP結束後/ CTx調整前	NED
0185-017 (33319768, LC#1)	3	0185-017	複製				2018-06-04	CTx調整後	PD

【圖126】

➢ 1期肺癌患者

0208-032 (血液)

波長	0185-032 (手術前)					0185-032 (手術後)					PC	NC
	NSE	SCC	CEA	Cyfra21-1	TPA	NSE	SCC	CEA	Cyfra21-1	TPA		
500	0.042	0.045	0.049	0.05	0.047	0.041	0.043	0.045	0.05	0.041	0.054	0.043
650	0.051	0.07	0.068	0.089	0.074	0.046	0.049	0.067	0.081	0.043	0.081	0.044
O.D	0.009	0.025	0.019	0.039	0.027	0.005	0.006	0.022	0.031	0.002	0.027	0.001
N- 計分 (O.D/0.015)	0.60	1.67	1.27	2.60	1.80	0.33	0.40	1.47	2.07	0.13	1.80	0.07

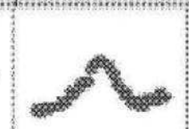
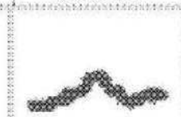
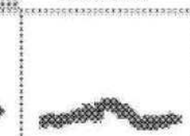
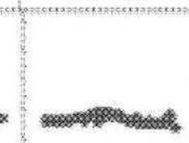
0208-032 臨床資訊

	CEA 位準 (< 5.0 正常)	個體編號	階段	T	N	M	採樣日期	樣本收集時間	患者狀態
0185-032 (33345046, LC#1)	2.7	0185-032	1A3	1c	0	0	2018-11-30	手術前	NED
0185-032 (33345046, LC#2)	2.7	0185-032	複製				2018-12-20	手術後	

【圖127】

➢ 1期肺癌患者

0185-044 (血液)

0185-44 (手術前)						0185-44 (手術後)							
波長	NSE	SCC	CEA	Cyfra21-1	TPA	波長	NSE	SCC	CEA	Cyfra21-1	TPA	PC	NC
500	0.039	0.047	0.043	0.041	0.045	500	0.04	0.042	0.04	0.039	0.043	0.042	0.039
650	0.043	0.07	0.06	0.042	0.055	650	0.049	0.055	0.045	0.042	0.053	0.051	0.039
O.D	0.004	0.023	0.017	0.001	0.010	O.D	0.009	0.013	0.005	0.003	0.01	0.009	0.000
													

0208-044 臨床資訊

	CEA 位準 (< 5.0 正常)	個體編號	階段	T	N	M	樣本日期	採樣時間	患者狀態
0185-044 (33349665, LC#5)	1.6	0185-044	1A3	1c	x	0	2019-01-24	手術前	計劃完整切除
0185-044 (33349665_LC#2)	1.4	0185-044	複製				2019-02-25	手術後 (不完全切除)	

【圖128】

20191014　正常 #1 金氏(M/)

金氏(Kim)

波長	NSE	SCC	CEA	Cyfra21-1	TPA
500	0.038	0.039	0.039	0.04	0.04
650	0.039	0.042	0.038	0.038	0.041
O.D	0.001	0.003	-0.001	-0.002	0.001



20191014　正常 #2 金氏(F/)

金氏(Kim)

波長	NSE	SCC	CEA	Cyfra21-1	TPA	PC	NC
500	0.039	0.038	0.038	0.039	0.038	0.045	0.038
650	0.042	0.039	0.039	0.041	0.039	0.061	0.037
O.D	0.003	0.001	0.001	0.002	0.001	0.016	-0.001



20191014　正常 #3 趙氏(F/)

趙氏(Cho)

波長	NSE	SCC	CEA	Cyfra21-1	TPA
500	0.039	0.04	0.041	0.04	0.039
650	0.039	0.04	0.041	0.041	0.038
O.D	0.000	0.000	0.000	0.001	-0.001



20191014　正常 #4 趙氏(F/)

趙氏(Cho)

波長	NSE	SCC	CEA	Cyfra21-1	TPA	PC	NC
500	0.039	0.039	0.039	0.038	0.039	0.041	0.038
650	0.04	0.037	0.037	0.038	0.039	0.052	0.039
O.D	0.001	-0.002	-0.002	0.000	0.000	0.011	0.001



【圖129】

20191014 正常 #5 洪氏 (M/)

洪氏(Hong)					
波長	NSE	SCC	CEA	Cyfra21-1	TPA
500	0.039	0.043	0.038	0.04	0.038
650	0.038	0.043	0.04	0.038	0.036
O.D	-0.001	0.000	0.002	-0.002	-0.002

20191014 正常 #6 金氏(F/)

金氏(Kim)							
波長	NSE	SCC	CEA	Cyfra21-1	TPA	PC	NC
500	0.039	0.039	0.039	0.04	0.04	0.042	0.04
650	0.04	0.037	0.038	0.038	0.04	0.052	0.042
O.D	0.001	-0.002	-0.001	-0.002	0.000	0.010	0.002

20191014 正常 #7 李氏 (M/)

李氏(Lee)					
波長	NSE	SCC	CEA	Cyfra21-1	TPA
500	0.039	0.038	0.04	0.039	0.039
650	0.037	0.038	0.039	0.039	0.039
O.D	-0.002	0.000	-0.001	0.000	0.000

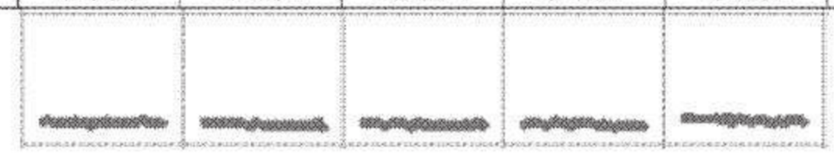
20191014 正常 #8 于氏 (F/)

于氏(Woo)					
波長	NSE	SCC	CEA	Cyfra21-1	TPA
500	0.04	0.037	0.038	0.039	0.04
650	0.04	0.038	0.039	0.04	0.039
O.D	0.000	0.001	0.001	0.001	-0.001

【圖130】

20191014 正常 #9 趙氏1 (M/)

波長	NSE	SCC	CEA	Cyfra21-1	TPA	PC	NC
500	0.04	0.04	0.04	0.039	0.043	0.042	0.04
650	0.04	0.038	0.039	0.04	0.041	0.055	0.042
O.D	0.000	-0.002	-0.001	0.001	-0.002	0.013	0.002



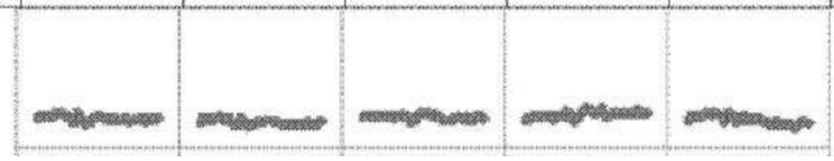
20191014 正常 #10 李氏 (M/)

波長	NSE	SCC	CEA	Cyfra 21-1	TPA
500	0.038	0.037	0.037	0.037	0.039
650	0.04	0.039	0.038	0.039	0.04
O.D	0.002	0.002	0.001	0.002	0.001



20191014 正常 #11 盧氏 (M/)

波長	NSE	SCC	CEA	Cyfra 21-1	TPA	PC	NC
500	0.038	0.036	0.038	0.037	0.037	0.046	0.037
650	0.038	0.036	0.04	0.039	0.037	0.072	0.037
O.D	0.000	0.000	0.002	0.002	0.000	0.026	0



【圖131】

20191015 正常 #1 申氏 (M/)

申氏(微血管血液)					
波長	NSE	SCC	CEA	Cyfra 21-1	TPA
500	0.038	0.037	0.037	0.039	0.038
650	0.042	0.037	0.037	0.04	0.04
O.D	0.004	0.000	0.000	0.001	0.002



申氏(靜脈血液)							
波長	NSE	SCC	CEA	Cyfra 21-1	TPA	PC	NC
500	0.037	0.038	0.039	0.037	0.037	0.043	0.037
650	0.039	0.039	0.041	0.041	0.04	0.06	0.037
O.D	0.002	0.001	0.002	0.004	0.003	0.017	0



20191015 正常 #2 李氏 (M/)

李氏(微血管血液)					
波長	NSE	SCC	CEA	Cyfra 21-1	TPA
500	0.038	0.038	0.037	0.037	0.037
650	0.038	0.038	0.038	0.038	0.039
O.D	0.000	0.000	0.001	0.001	0.002



李氏(靜脈血液)							
波長	NSE	SCC	CEA	Cyfra 21-1	TPA	PC	NC
500	0.037	0.039	0.04	0.038	0.037	0.042	0.039
650	0.039	0.039	0.042	0.037	0.036	0.065	0.038
O.D	0.002	0.000	0.002	-0.001	-0.001	0.023	-0.001



【圖132】

盲測

20191015 正常 #3 魯氏(M/)

魯氏(微血管血液)					
波長	NSE	SCC	CEA	Cyfra 21-1	TPA
500	0.038	0.039	0.04	0.04	0.038
650	0.04	0.043	0.041	0.04	0.038
O.D	0.002	0.004	0.001	0.000	0

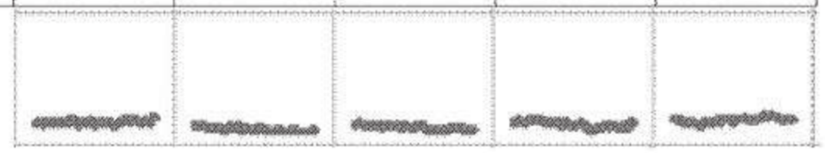


魯氏(靜脈血液)							
波長	NSE	SCC	CEA	Cyfra 21-1	TPA	PC	NC
500	0.038	0.039	0.037	0.038	0.038	0.046	0.037
650	0.039	0.039	0.037	0.038	0.042	0.072	0.039
O.D	0.001	0.000	0.000	0.000	0.004	0.026	0.002



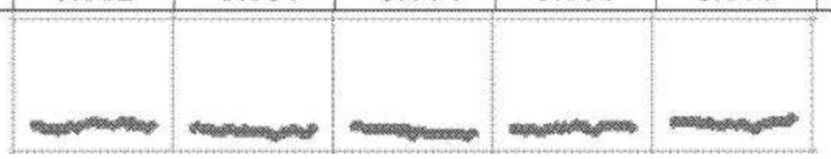
20191015 正常 #4 柳氏(M/)

柳氏					
波長	NSE	SCC	CEA	Cyfra 21-1	TPA
500	0.041	0.04	0.04	0.041	0.043
650	0.04	0.037	0.039	0.04	0.042
O.D	-0.001	-0.003	-0.001	-0.001	-0.001



20191015 正常 #5 金氏(F/)

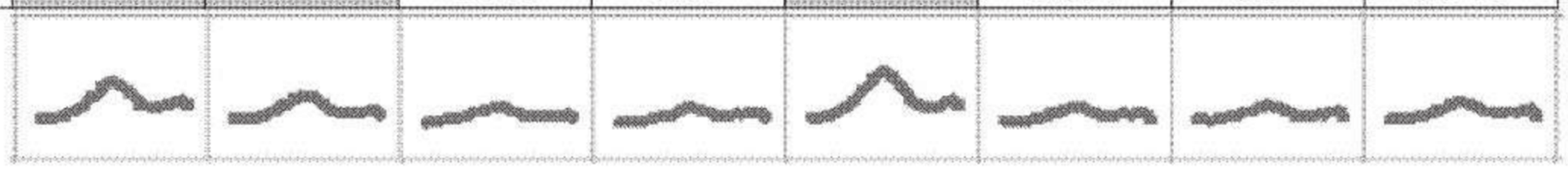
金氏							
波長	NSE	SCC	CEA	Cyfra 21-1	TPA	PC	NC
500	0.042	0.041	0.042	0.041	0.043	0.045	0.041
650	0.044	0.04	0.038	0.042	0.043	0.057	0.038
O.D	0.002	-0.001	-0.004	0.001	0.000	0.012	-0.003



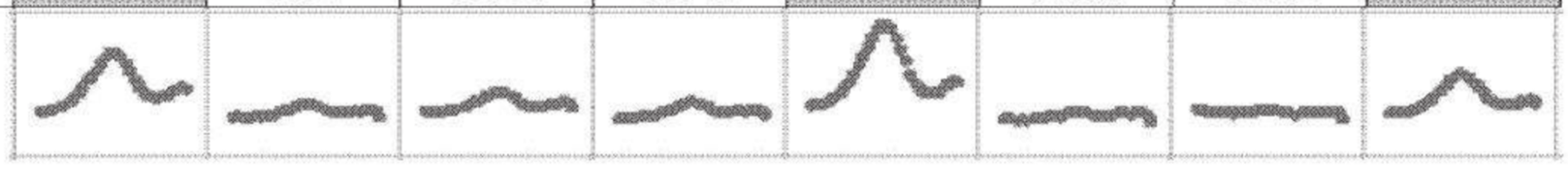
【圖133】

➢ 前列腺癌

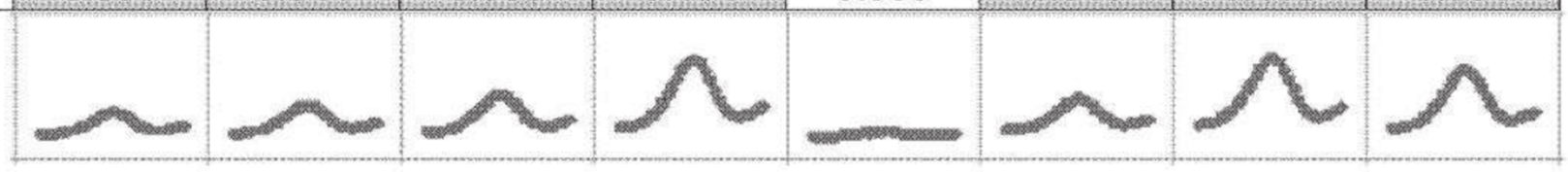
PC#41 (前列腺癌患者)

Wav.	PSA, 27	PSA, 95	PSMA, 27	PSMA, 95	PAP, 27	PAP, 95	PAC3, 27	PAC3, 95
500	0.043	0.043	0.04	0.041	0.043	0.041	0.042	0.042
650	0.069	0.06	0.051	0.051	0.076	0.052	0.052	0.055
	0.026	0.017	0.011	0.01	0.033	0.011	0.01	0.013
								

PC#47 (前列腺癌患者)

Wav.	PSA, 27	PSA, 95	PSMA, 27	PSMA, 95	PAP, 27	PAP, 95	PAC3, 27	PAC3, 95
500	0.045	0.041	0.045	0.041	0.049	0.04	0.048	0.044
650	0.087	0.051	0.059	0.052	0.108	0.045	0.047	0.072
	0.042	0.01	0.014	0.011	0.059	0.005	-0.001	0.028
								

PC#44 (前列腺癌患者)

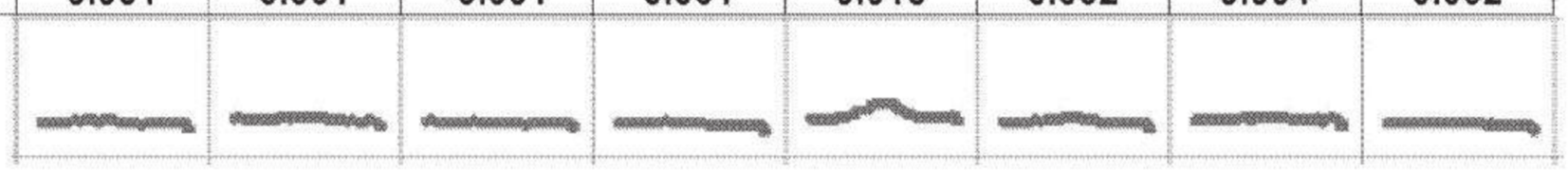
Wav.	PSA, 27	PSA, 95	PSMA, 27	PSMA, 95	PAP, 27	PAP, 95	PAC3, 27	PAC3, 95
500	0.045	0.046	0.048	0.056	0.04	0.051	0.059	0.053
650	0.078	0.09	0.106	0.16	0.049	0.099	0.162	0.144
	0.033	0.044	0.058	0.104	0.009	0.048	0.103	0.091
								

截止 > 0.015

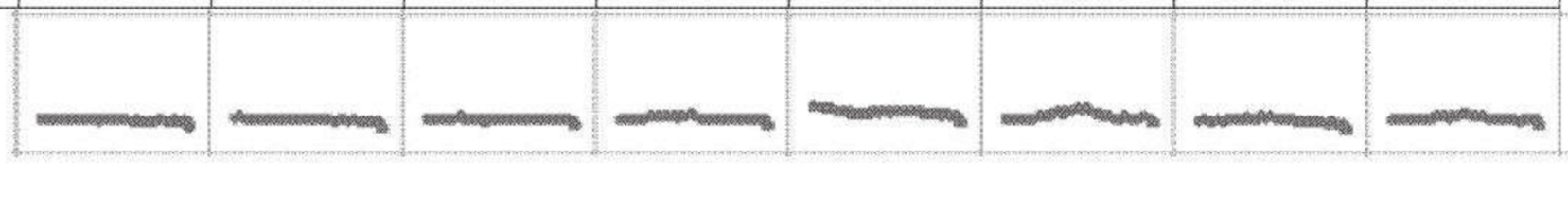
【圖134】

➢ 前列腺癌

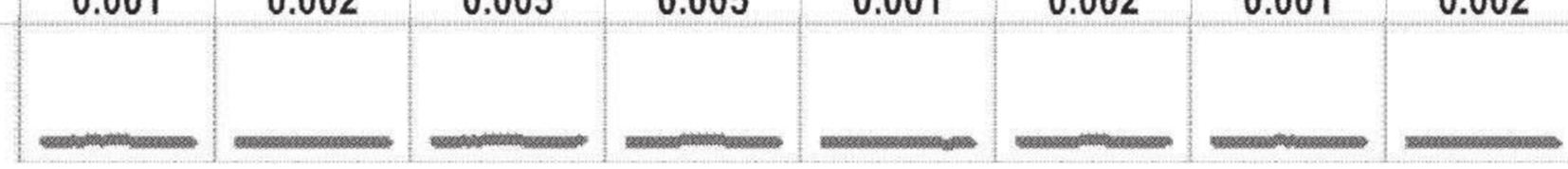
正常 #1

WAV.	PSA, 27	PSA, 95	PSMA, 27	PSMA, 95	PAP, 27	PAP, 95	PAC3, 27	PAC3, 95
500	0.039	0.042	0.04	0.038	0.041	0.04	0.04	0.038
650	0.04	0.043	0.039	0.039	0.054	0.042	0.044	0.04
	0.001	0.001	-0.001	0.001	0.013	0.002	0.004	0.002
								

正常 (趙氏)

WAV.	PSA, 27	PSA, 95	PSMA, 27	PSMA, 95	PAP, 27	PAP, 95	PAC3, 27	PAC3, 95
500	0.039	0.04	0.039	0.038	0.049	0.039	0.038	0.038
650	0.039	0.04	0.039	0.042	0.045	0.047	0.04	0.042
	0	0	0	0.004	-0.004	0.008	0.002	0.004
								

正常 #2

WAV.	PSA, 27	PSA, 95	PSMA, 27	PSMA, 95	PAP, 27	PAP, 95	PAC3, 27	PAC3, 95
500	0.041	0.039	0.041	0.04	0.039	0.041	0.04	0.039
650	0.042	0.041	0.044	0.045	0.04	0.043	0.041	0.041
	0.001	0.002	0.003	0.005	0.001	0.002	0.001	0.002
								

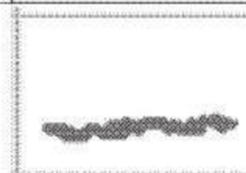
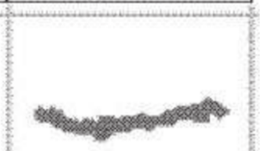
截止 > 0.015

【圖135】

➢ 前列腺癌患者 #1, 2

波長	TMPRSS2-ERG 融合	TMPRSS2-ERG 融合
500	0.051	0.052
650	0.064	0.077
	0.013	0.025
	1.30	2.50
		

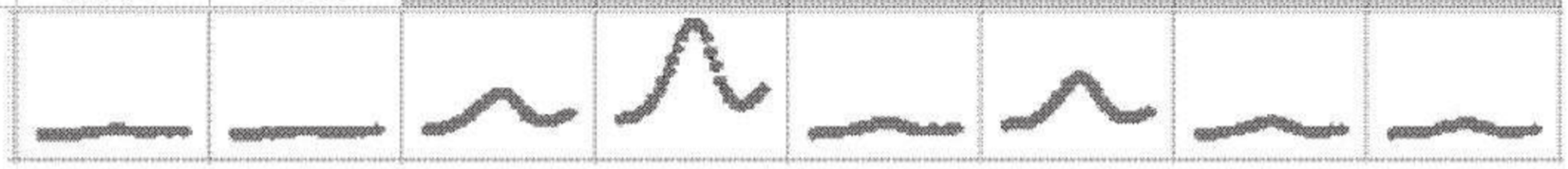
➢ 正常 #1, 2

波長	TMPRSS2-ERG 融合	TMPRSS2-ERG 融合
500	0.043	0.046
650	0.043	0.044
	0	-0.002
	0.00	-0.20
		

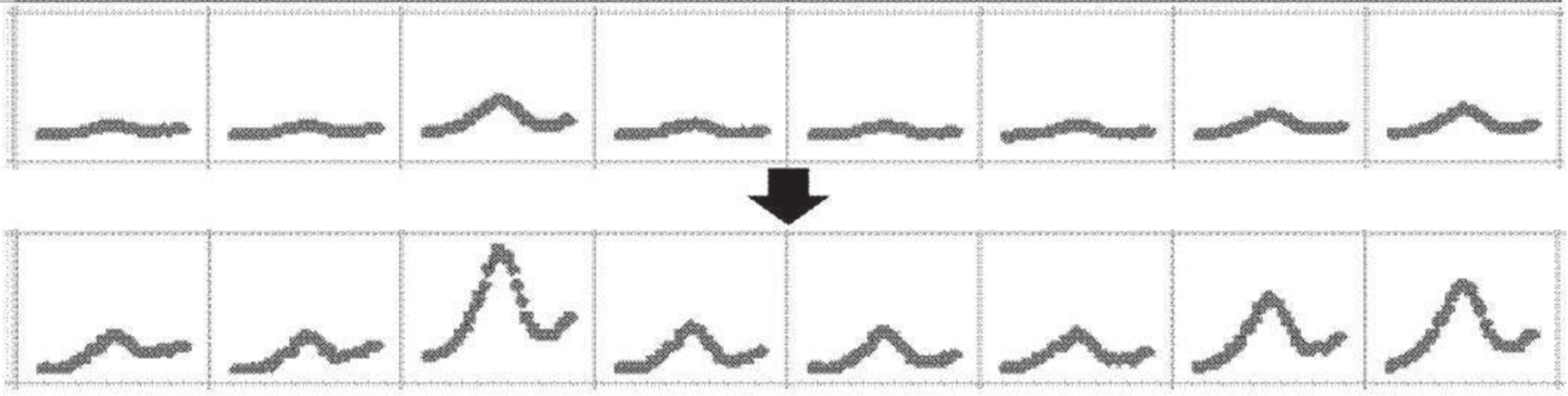
【圖136】

➢ 甲狀腺癌

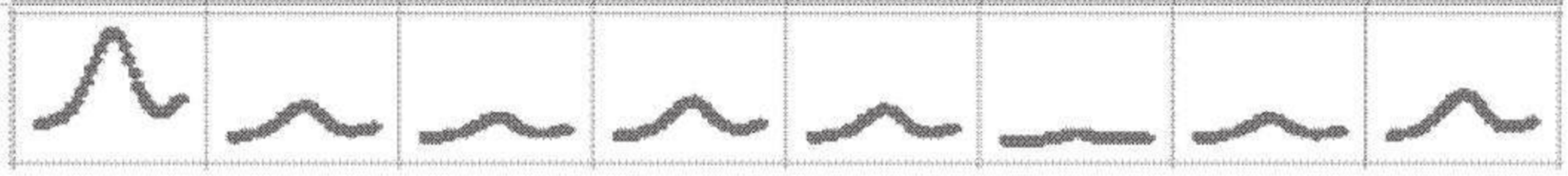
TC#42

WAV.	CEA, 27	CEA, 95	NSE, 27	NSE, 95	TG, 27	TG, 95	CALCA, 27	CALCA, 95
500	0.04	0.04	0.045	0.057	0.041	0.051	0.04	0.04
650	0.046	0.045	0.09	0.177	0.055	0.109	0.056	0.053
	0.006	0.005	0.045	0.12	0.014	0.058	0.016	0.013
								

TC#43

WAV.	CEA, 27	CEA, 95	NSE, 27	NSE, 95	TG, 27	TG, 95	CALCA, 27	CALCA, 95
500	0.041	0.041	0.046	0.042	0.041	0.04	0.042	0.043
650	0.054	0.054	0.084	0.056	0.053	0.054	0.067	0.073
	0.013	0.013	0.038	0.014	0.012	0.014	0.025	0.03
								

TC#41

WAV.	CEA, 27	CEA, 95	NSE, 27	NSE, 95	TG, 27	TG, 95	CALCA, 27	CALCA, 95
500	0.065	0.046	0.045	0.047	0.045	0.04	0.045	0.047
650	0.204	0.093	0.075	0.099	0.087	0.05	0.075	0.11
	0.139	0.047	0.03	0.052	0.042	0.01	0.03	0.063
								

截止 > 0.01

【圖137】

- 甲狀腺癌

正常 #1

WAV.	CEA, 27	CEA, 95	NSE, 27	NSE, 95	TG, 27	TG, 95	CALCA, 27	CALCA, 95
500	0.038	0.039	0.039	0.038	0.041	0.04	0.039	0.039
650	0.04	0.04	0.038	0.041	0.041	0.04	0.04	0.041
	0.002	0.001	-0.001	0.003	0	0	0.001	0.002

正常 #2

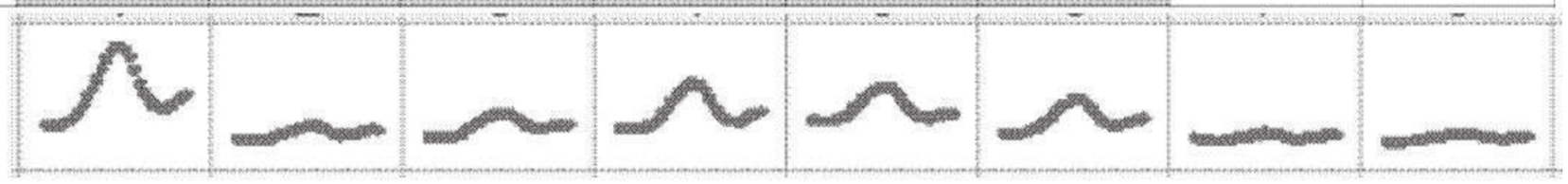
WAV.	CEA, 27	CEA, 95	NSE, 27	NSE, 95	TG, 27	TG, 95	CALCA, 27	CALCA, 95
500	0.038	0.038	0.039	0.039	0.041	0.041	0.04	0.039
650	0.042	0.039	0.04	0.039	0.043	0.043	0.041	0.04
	0.004	0.001	0.001	0	0.002	0.002	0.001	0.001

截止 > 0.01

【圖138】

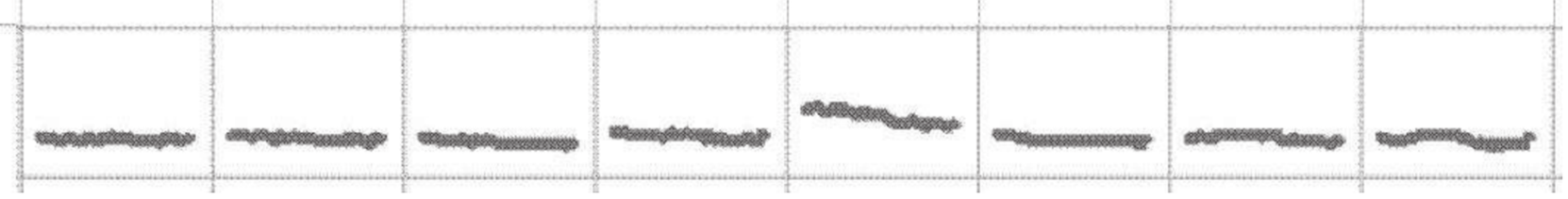
前列腺癌患者

波長	BRAF V600E	TERT C228T	TERT C250T	BRAF V600E	TERT C228T	TERT C250T	PC	NC
500	0.055	0.046	0.047	0.052	0.059	0.05	0.046	0.043
650	0.11	0.054	0.064	0.085	0.082	0.073	0.05	0.05
O.D	0.055	0.008	0.017	0.033	0.023	0.023	0.004	0.007
N-計分 (O.D/0.01)	5.50	0.80	1.70	3.30	2.30	2.30	0.40	0.70



正常 sub.

波長	BRAF V600E	TERT C228T	TERT C250T	BRAF V600E	TERT C228T	TERT C250T	PC	NC
500	0.041	0.042	0.041	0.043	0.053	0.043	0.041	0.041
650	0.042	0.042	0.039	0.043	0.05	0.04	0.042	0.042
O.D	0.001	0.000	-0.002	0.000	-0.003	-0.003	0.001	0.001
N-計分 (O.D/0.01)	0.10	0.00	-0.20	0.00	-0.30	-0.30	0.10	0.10



【圖139】

➢ 膀胱癌

BDC#92 (膀胱癌患者)

WAV.	OGT	FGFR3	TP53	NMP22	Cyfra21-1
500	0.044	0.041	0.041	0.041	0.039
650	0.071	0.046	0.061	0.037	0.037
	0.027	0.005	0.02	-0.004	-0.002



BDC#95 (膀胱癌患者)

OGT	FGFR3	TP53	NMP22	Cyfra21-1
0.046	0.047	0.043	0.047	0.043
0.076	0.079	0.061	0.083	0.055
0.03	0.032	0.018	0.036	0.012



BDC#38 (血尿)

WAV.	OGT	FGFR3	TP53	NMP22	Cyfra21-1
500	0.039	0.04	0.039	0.04	0.039
650	0.039	0.038	0.037	0.038	0.039
	0	-0.002	-0.002	-0.002	0

BDC#88 (血尿)

OGT	FGFR3	TP53	NMP22	Cyfra21-1
0.04	0.04	0.039	0.039	0.04
0.038	0.038	0.037	0.037	0.039
-0.002	-0.002	-0.002	-0.002	-0.001

正常 #3

WAV.	OGT	FGFR3	TP53	NMP22	Cyfra21-1
500	0.039	0.04	0.04	0.039	0.038
650	0.038	0.037	0.038	0.037	0.036
	-0.001	-0.003	-0.002	-0.002	-0.002

正常 #4

OGT	FGFR3	TP53	NMP22	Cyfra21-1
0.042	0.04	0.092	0.038	0.039
0.04	0.037	0.094	0.037	0.037
-0.002	-0.003	0.002	-0.001	-0.002

截止 > 0.01

【圖140】

➢ 乳癌

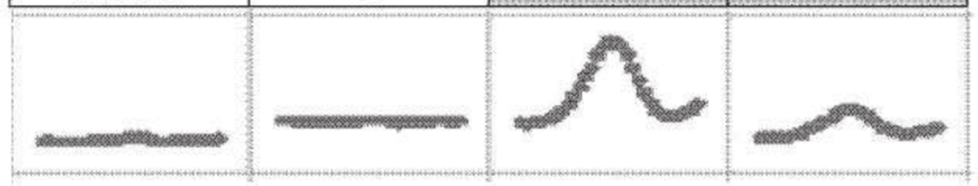
BC #78

WAV.	CA27-29 (CA15-3), 27	CA27-29 (CA15-3), 95	CEA, 27	CEA, 95
500	0.049	0.039	0.041	0.044
650	0.092	0.045	0.051	0.069
	0.043	0.006	0.01	0.025



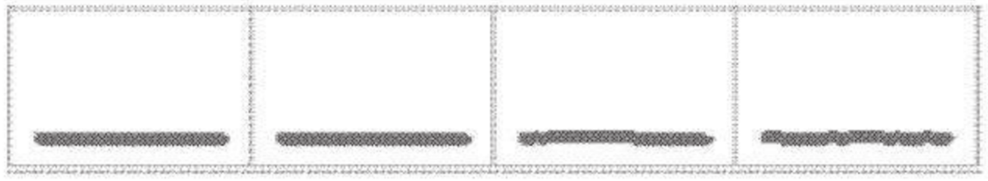
BC #79

CA27-29 (CA15-3), 27	CA27-29 (CA15-3), 95	CEA, 27	CEA, 95
0.042	0.064	0.061	0.045
0.045	0.064	0.143	0.074
0.003	0	0.082	0.029



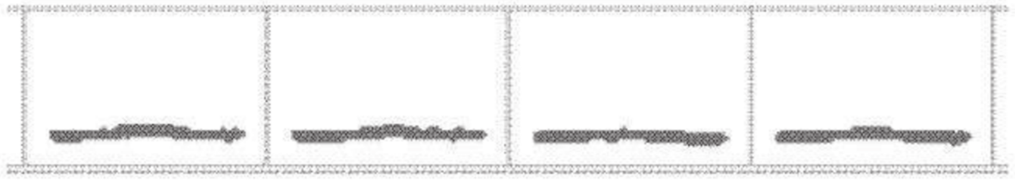
正常 (趙氏)

CA27-29 (CA15-3), 27	CA27-29 (CA15-3), 95	CEA, 27	CEA, 95
0.037	0.038	0.038	0.039
0.037	0.038	0.04	0.04
0	0	0.002	0.001



正常 #1

CA27-29 (CA15-3), 27	CA27-29 (CA15-3), 95	CEA, 27	CEA, 95
0.04	0.041	0.039	0.039
0.048	0.044	0.041	0.044
0.008	0.003	0.002	0.005



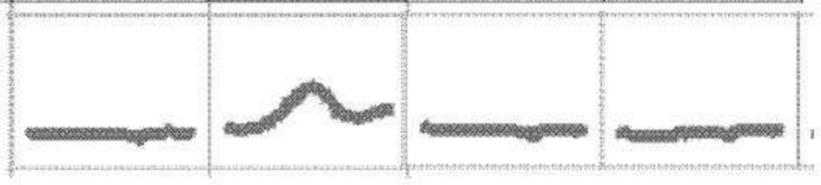
截止 > 0.01

【圖141】

➢ 大腸癌)

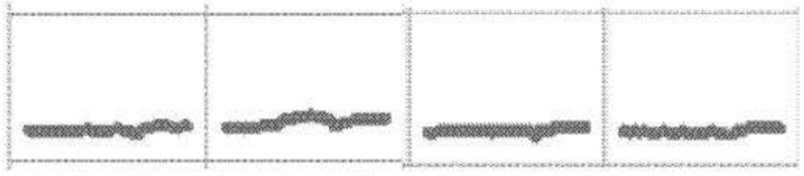
CC #2

WAV.	CEA, 27	CEA, 95	CA19-9, 27	CA19-9, 95
500	0.043	0.047	0.046	0.041
650	0.042	0.084	0.044	0.041
	-0.001	0.037	-0.002	0



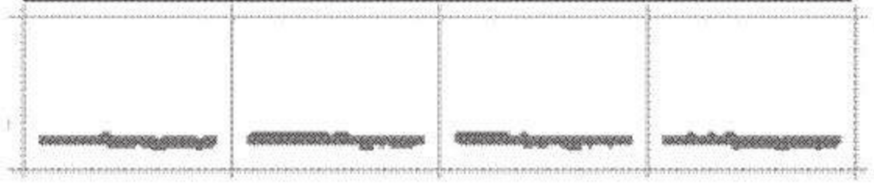
CC #3

WAV.	CEA, 27	CEA, 95	CA19-9, 27	CA19-9, 95
500	0.04	0.043	0.041	0.041
650	0.04	0.054	0.041	0.04
	0	0.011	0	-0.001



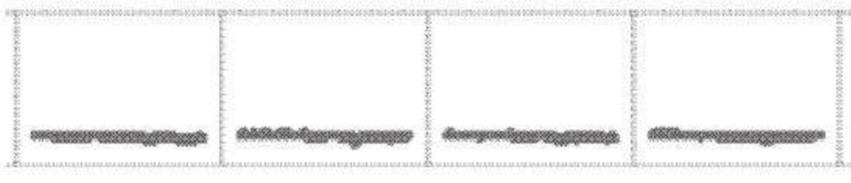
正常 (趙氏)

CEA, 27	CEA, 95	CA19-9, 27	CA19-9, 95
0.038	0.039	0.039	0.038
0.037	0.039	0.038	0.037
-0.001	0	-0.001	-0.001



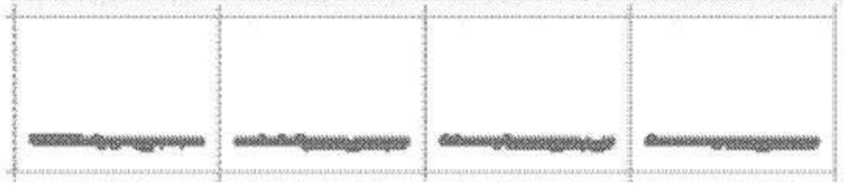
正常 #1

CEA, 27	CEA, 95	CA19-9, 27	CA19-9, 95
0.04	0.038	0.039	0.038
0.037	0.037	0.037	0.037
-0.003	-0.001	-0.002	-0.001



正常 #2

CEA, 27	CEA, 95	CA19-9, 27	CA19-9, 95
0.039	0.039	0.039	0.039
0.037	0.037	0.037	0.037
-0.002	-0.002	-0.002	-0.002



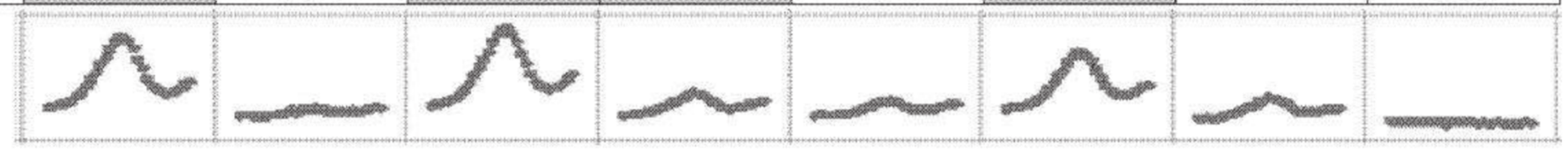
截止 > 0.01

【圖142】

➢ 膽道癌

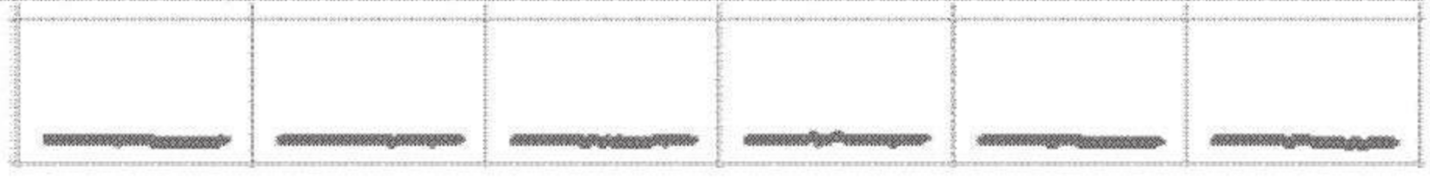
膽道癌患者

WAV.	CA19-9, 27	CA19-9, 95	CA125, 27	CA125, 95	CEA, 27	CEA, 95	PC	NC
500	0.049	0.042	0.049	0.042	0.042	0.047	0.04	0.038
650	0.099	0.047	0.105	0.059	0.053	0.088	0.055	0.038
	0.05	0.005	0.056	0.017	0.011	0.041	0.015	0
Int.	3.33	0.33	3.73	1.13	0.73	2.73	1.00	0.00



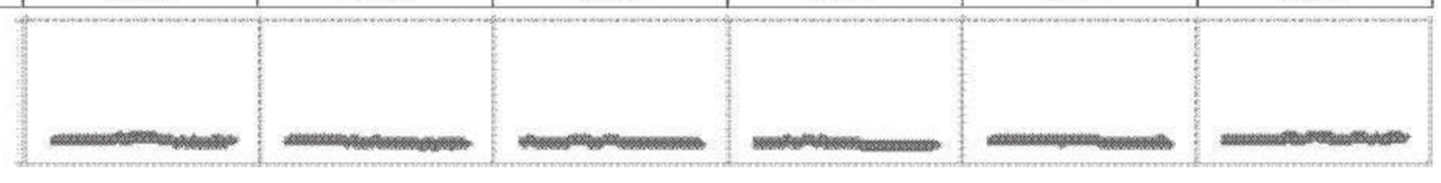
正常 #1

WAV.	CA19-9, 27	CA19-9, 95	CA125, 27	CA125, 95	CEA, 27	CEA, 95
500	0.04	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039
650	0.039	0.04	0.039	0.041	0.04	0.039
	-0.001	0.001	0	0.002	0.001	0
Int.	-0.07	0.07	0.00	0.13	0.07	0.00



正常 #2

WAV.	CA19-9, 27	CA19-9, 95	CA125, 27	CA125, 95	CEA, 27	CEA, 95
500	0.039	0.039	0.039	0.037	0.039	0.04
650	0.042	0.039	0.039	0.038	0.04	0.042
	0.003	0	0	0.001	0.001	0.002
Int.	0.20	0.00	0.00	0.07	0.07	0.13

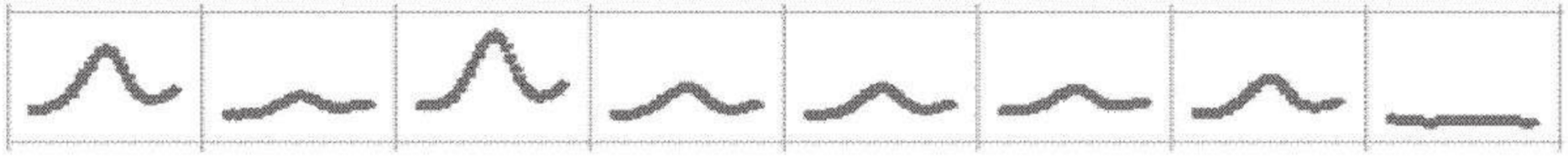


【圖143】

➢ 膽道癌

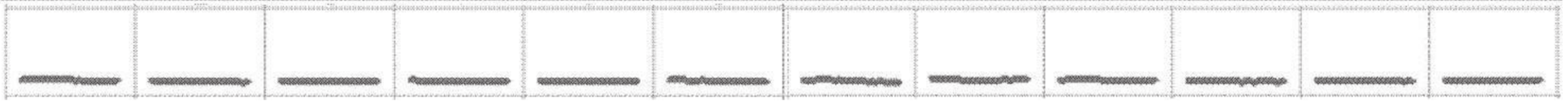
膽道癌患者

WAV.	CA19-9, 27	CA19-9, 95	CA125, 27	CA125, 95	CEA, 27	CEA, 95	PC	NC
500	0.053	0.047	0.058	0.046	0.047	0.052	0.049	0.041
650	0.137	0.073	0.158	0.085	0.084	0.082	0.097	0.037
	0.084	0.026	0.1	0.039	0.037	0.03	0.048	-0.004
Int.	1.75	0.54	2.08	0.81	0.77	0.63	1.00	-0.08



正常 sub.

WAV.	Nor(趙氏) CA125	Nor(趙氏) CA125	Nor(趙氏) CA19-9	Nor(趙氏) CA19-9	Nor(趙氏) CEA	Nor(趙氏) CEA	BC(Nor) CA125	BC(Nor) CA125	BC(Nor) CA19-9	BC(Nor) CA19-9	BC(Nor) CEA	BC(Nor) CEA
500	0.041	0.039	0.04	0.041	0.039	0.041	0.039	0.042	0.04	0.039	0.04	0.04
650	0.041	0.038	0.038	0.038	0.037	0.039	0.039	0.039	0.039	0.037	0.039	0.037
	0	-0.001	-0.002	-0.003	-0.002	-0.002	0	-0.003	-0.001	-0.002	-0.001	-0.003
Int.	0.00	-0.02	-0.04	-0.06	-0.04	-0.04	0.00	-0.06	-0.02	-0.04	-0.02	-0.06

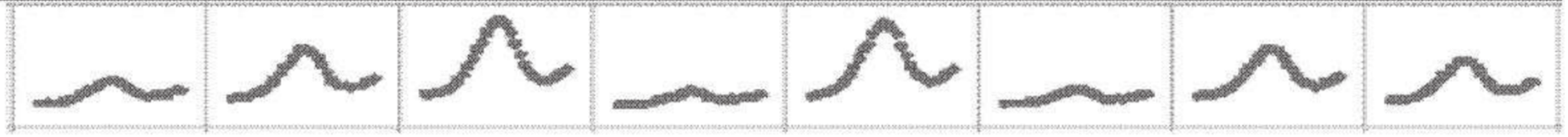


【圖144】

➢ 胃癌

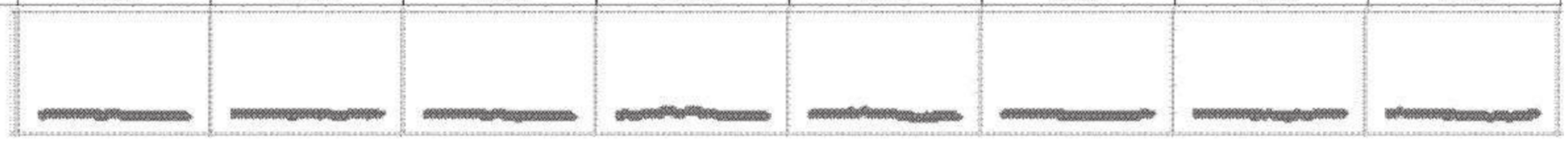
胃癌患者

WAV.	CEA, 27	CEA, 95	CA19-9, 27	CA19-9, 95	CGB, 27	CGB, 95	Cyfra21-1, 27	Cyfra21-1, 95
500	0.042	0.046	0.049	0.041	0.047	0.042	0.048	0.044
650	0.059	0.082	0.103	0.051	0.102	0.052	0.084	0.074
	0.017	0.036	0.054	0.01	0.055	0.01	0.036	0.03
Int.	1.13	2.40	3.60	0.67	3.67	0.67	2.40	2.00



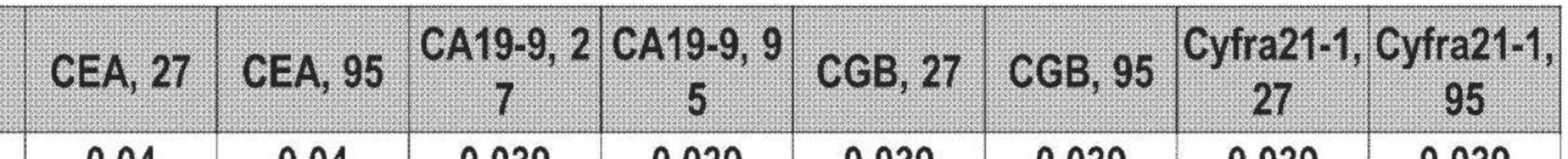
正常 #1

WAV.	CEA, 27	CEA, 95	CA19-9, 27	CA19-9, 95	CGB, 27	CGB, 95	Cyfra21-1, 27	Cyfra21-1, 95
500	0.038	0.04	0.039	0.038	0.039	0.039	0.04	0.04
650	0.039	0.04	0.039	0.041	0.04	0.038	0.039	0.039
	0.001	0	0	0.003	0.001	-0.001	-0.001	-0.001
Int.	0.07	0.00	0.00	0.20	0.07	-0.07	-0.07	-0.07



正常 #2

WAV.	CEA, 27	CEA, 95	CA19-9, 27	CA19-9, 95	CGB, 27	CGB, 95	Cyfra21-1, 27	Cyfra21-1, 95
500	0.04	0.04	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039
650	0.04	0.041	0.042	0.04	0.038	0.038	0.038	0.038
	0	0.001	0.003	0.001	-0.001	-0.001	-0.001	-0.001
Int.	0.00	0.07	0.20	0.07	-0.07	-0.07	-0.07	-0.07

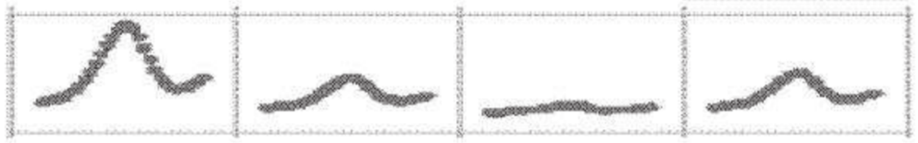


【圖145】

➢ 卵巢癌

卵巢癌患者

WAV.	CA125, 27	CA125, 95	CEA, 27	CEA, 95
500	0.061	0.05	0.042	0.05
650	0.193	0.102	0.053	0.109
	0.132	0.052	0.011	0.059
Int.	2.32	0.91	0.19	1.04



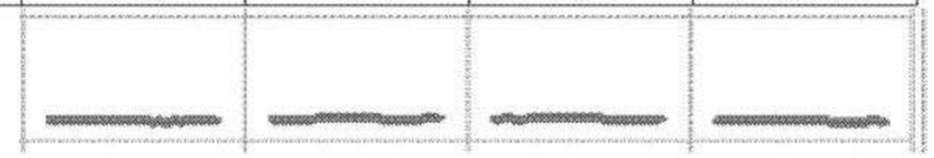
正常 #1 (趙氏)

WAV.	CA125, 27	CA125, 95	CEA, 27	CEA, 95
500	0.043	0.04	0.04	0.042
650	0.041	0.041	0.041	0.045
	-0.002	0.001	0.001	0.003
Int.	-0.04	0.02	0.02	0.05



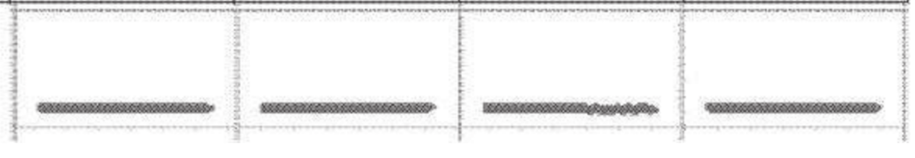
正常 #2

WAV.	CA125, 27	CA125, 95	CEA, 27	CEA, 95
500	0.041	0.042	0.043	0.04
650	0.04	0.045	0.045	0.04
	-0.001	0.003	0.002	0
Int.	-0.02	0.05	0.04	0.00



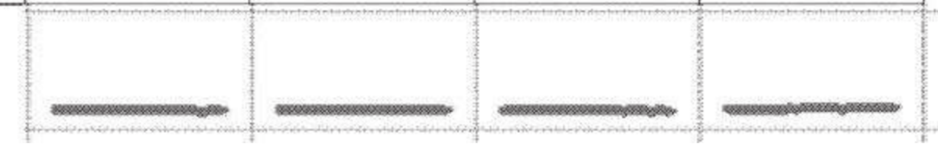
正常 #1 (趙氏)

WAV.	CA125, 27	CA125, 95	CEA, 27	CEA, 95
500	0.041	0.041	0.04	0.042
650	0.042	0.042	0.04	0.042
	0.001	0.001	0	0
Int.	0.02	0.02	0.00	0.00



正常 #2

WAV.	CA125, 27	CA125, 95	CEA, 27	CEA, 95
500	0.04	0.041	0.04	0.043
650	0.042	0.041	0.04	0.044
	0.002	0	0	0.001
Int.	0.04	0.00	0.00	0.02

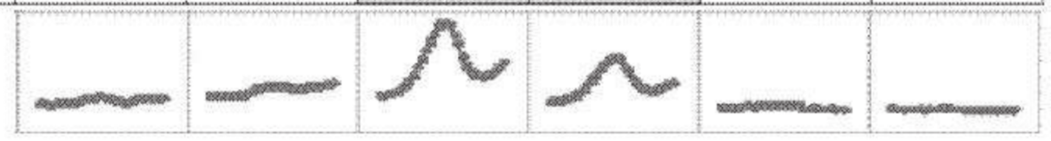


【圖146】

➢ 胰臟癌

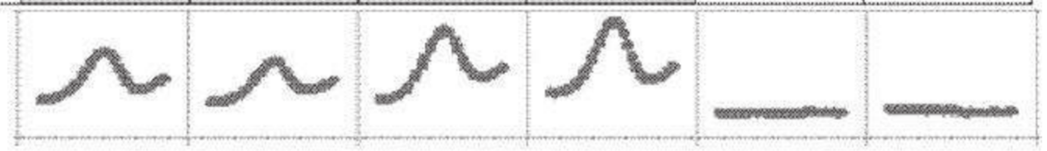
胰臟癌患者 #1

WAV.	CEA	CEA	CA19-9	CA19-9	CA125	CA125
500	0.042	0.046	0.047	0.043	0.04	0.039
650	0.046	0.052	0.089	0.068	0.041	0.039
	0.004	0.006	0.042	0.025	0.001	0
Int.	0.16	0.24	1.68	1	0.04	0



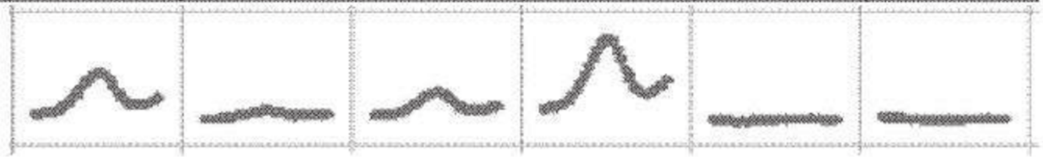
胰臟癌患者 #2

WAV.	CEA	CEA	CA19-9	CA19-9	CA125	CA125
500	0.046	0.044	0.046	0.05	0.039	0.042
650	0.072	0.067	0.084	0.088	0.038	0.04
	0.026	0.023	0.038	0.038	-0.001	-0.002
Int.	0.79	0.70	1.15	1.15	-0.03	-0.06



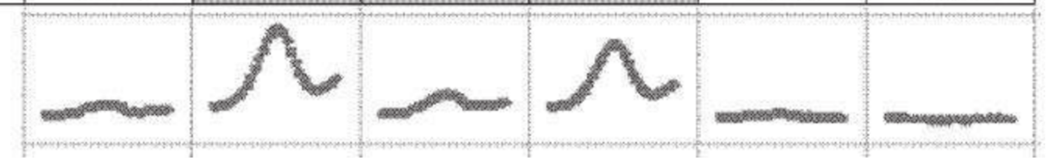
胰臟癌患者 #3

WAV.	CEA	CEA	CA19-9	CA19-9	CA125	CA125
500	0.046	0.04	0.044	0.053	0.039	0.043
650	0.097	0.051	0.073	0.137	0.04	0.039
	0.051	0.011	0.029	0.084	0.001	-0.004
Int.	1.55	0.33	0.88	2.55	0.03	-0.12



胰臟癌患者 #4

WAV.	CEA	CEA	CA19-9	CA19-9	CA125	CA125
500	0.042	0.051	0.044	0.05	0.04	0.039
650	0.054	0.134	0.064	0.117	0.044	0.037
	0.012	0.083	0.02	0.067	0.004	-0.002
Int.	0.46	3.19	0.77	2.58	0.15	-0.08

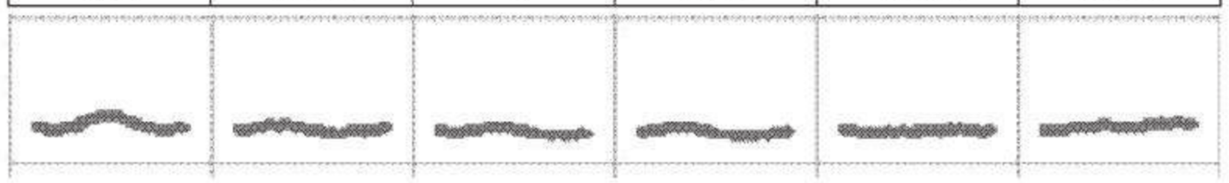


【圖147】

➢ 胰臟癌

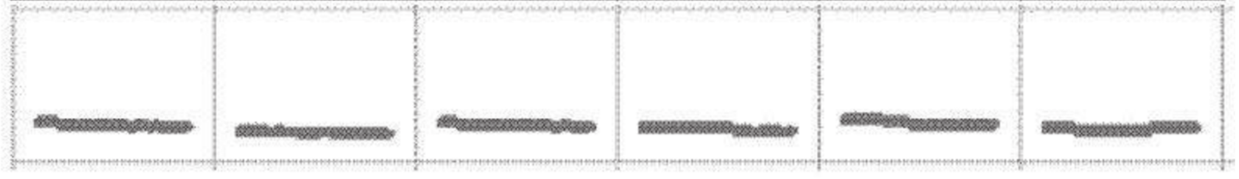
正常 sub. #1

BC(Nor), CEA	BC(Nor), CEA	BC(Nor) CA19-9	BC(Nor) CA19-9	BC(Nor), CA125	BC(Nor), CA125
0.043	0.041	0.041	0.04	0.042	0.041
0.048	0.042	0.041	0.039	0.041	0.043
0.005	0.001	0	-0.001	-0.001	0.002
0.2	0.04	0	-0.04	-0.04	0.08



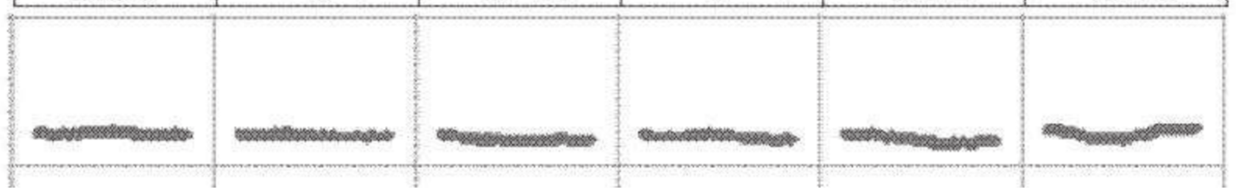
正常 sub. #2

BC(Nor), CEA	BC(Nor), CEA	BC(Nor) CA19-9	BC(Nor) CA19-9	BC(Nor), CA125	BC(Nor), CA125
0.046	0.039	0.047	0.042	0.049	0.042
0.044	0.037	0.045	0.041	0.045	0.039
-0.002	-0.002	-0.002	-0.001	-0.004	-0.003
-0.08	-0.08	-0.08	-0.04	-0.15	-0.12



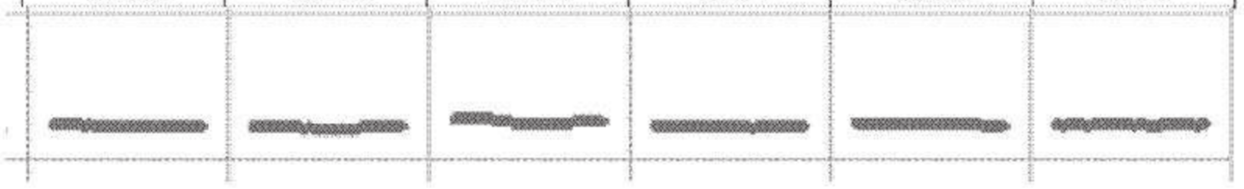
正常 sub. #3

Nor (趙氏), CEA	Nor (趙氏), CEA	Nor (趙氏) CA19-9	Nor (趙氏) CA19-9	Nor (趙氏), CA125	Nor (趙氏), CA125
0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.042
0.042	0.04	0.037	0.04	0.037	0.038
0.002	0	-0.003	0	-0.003	-0.004
0.08	0	-0.12	0	-0.12	-0.16



正常 sub. #4

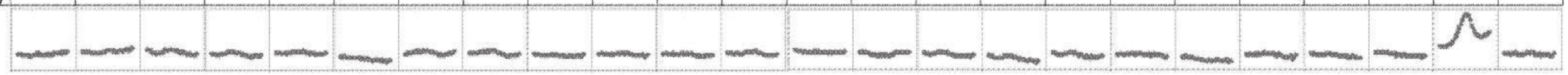
Nor (趙氏) CEA	Nor (趙氏) CEA	Nor (趙氏) CA19-9	Nor (趙氏) CA19-9	Nor (趙氏) CA125	Nor (趙氏) CA125
0.044	0.042	0.049	0.043	0.046	0.043
0.042	0.039	0.045	0.042	0.045	0.044
-0.002	-0.003	-0.004	-0.001	-0.001	0.001
-0.08	-0.12	-0.15	-0.04	-0.04	0.04



【圖148】

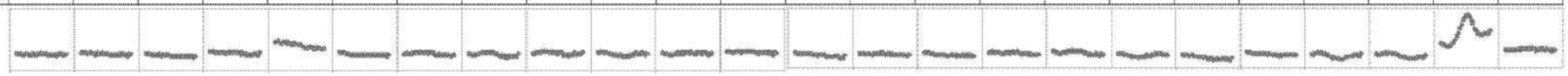
20191007 正常 sub. #1 (M/)

波長	NMP22	Cyfra 21-1	OGT	CEA	ENO2	TG	CALCA	BRAF V600E	NSE	SCC	TPA	AFP	CGB	CA19-9	PSA	PSMA	PAP	PCA3	TMPRSS2 -ERG	CA125	HIF-1a	VEGF	PC	NC
500	0.041	0.044	0.045	0.041	0.043	0.038	0.041	0.042	0.041	0.042	0.042	0.043	0.045	0.043	0.041	0.04	0.042	0.041	0.038	0.04	0.041	0.042	0.049	0.041
650	0.041	0.046	0.045	0.043	0.044	0.037	0.044	0.045	0.04	0.042	0.041	0.043	0.043	0.04	0.041	0.038	0.04	0.041	0.035	0.041	0.041	0.04	0.078	0.042
O.D	0.000	0.002	0.000	0.002	0.001	-0.001	0.003	0.003	-0.001	0.000	-0.001	0.000	-0.002	-0.003	0.000	-0.002	-0.002	0.000	-0.003	0.001	0.000	-0.002	0.029	0.001
N- 計分 (O.D/0.01)	0.00	0.20	0.00	0.20	0.10	-0.10	0.30	0.30	-0.10	0.00	-0.10	0.00	-0.20	-0.30	0.00	-0.20	-0.20	0.00	-0.30	0.10	0.00	-0.20	2.90	0.10



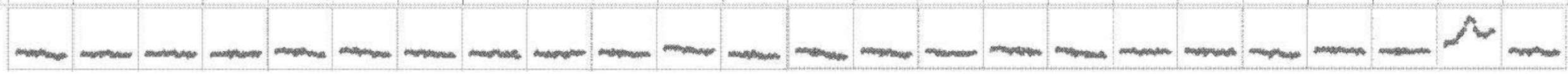
20191007 正常 sub. #2 (M/)

波長	NMP22	Cyfra 21-1	OGT	CEA	ENO2	TG	CALCA	BRAF V600E	TP53	SCC	TPA	AFP	CGB	CA19-9	PSA	PSMA	PAP	PCA3	TMPRSS2 -ERG	CA125	HIF-1a	VEGF	PC	NC
500	0.041	0.042	0.041	0.043	0.053	0.043	0.041	0.041	0.042	0.043	0.042	0.043	0.041	0.041	0.041	0.041	0.042	0.04	0.039	0.042	0.04	0.039	0.049	0.044
650	0.042	0.042	0.039	0.043	0.05	0.04	0.042	0.042	0.042	0.04	0.043	0.044	0.039	0.04	0.039	0.042	0.043	0.037	0.034	0.039	0.036	0.037	0.077	0.045
O.D	0.001	0.000	-0.002	0.000	-0.003	-0.003	0.001	0.001	0.000	-0.003	0.001	0.001	-0.002	-0.001	-0.002	0.001	0.001	-0.003	-0.005	-0.003	-0.004	-0.002	0.028	0.001
N- 計分 (O.D/0.01)	0.10	0.00	-0.20	0.00	-0.30	-0.30	0.10	0.10	0.00	-0.30	0.10	0.10	-0.20	-0.10	-0.20	0.10	0.10	-0.30	-0.50	-0.30	-0.40	-0.20	2.80	0.10



20191007 正常 sub. #3 (M/)

波長	NMP22	Cyfra 21-1	OGT	CEA	ENO2	TG	CALCA	BRAF V 600E	TP53	SCC	TPA	AFP	CGB	CA19-9	PSA	PSMA	PAP	PCA3	TMPRSS2 -ERG	CA125	HIF-1a	VEGF	PC	NC
500	0.038	0.037	0.037	0.037	0.039	0.039	0.038	0.038	0.038	0.038	0.041	0.037	0.039	0.038	0.039	0.04	0.039	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038	0.043	0.038
650	0.039	0.038	0.038	0.039	0.039	0.04	0.038	0.039	0.038	0.039	0.041	0.039	0.038	0.037	0.038	0.04	0.038	0.039	0.039	0.038	0.04	0.04	0.06	0.04
O.D	0.001	0.001	0.001	0.002	0.000	0.001	0.000	0.001	0.000	0.001	0.000	0.002	-0.001	-0.001	-0.001	0.000	-0.001	0.001	0.001	0.000	0.002	0.002	0.017	0.002
N- 計分 (O.D/0.01)	0.10	0.10	0.10	0.20	0.00	0.10	0.00	0.10	0.00	0.10	0.00	0.20	-0.10	-0.10	-0.10	0.00	-0.10	0.10	0.10	0.00	0.20	0.20	1.70	0.20



【圖149】

正常 sub. #1 (F/)

波長	NMP22	Cyfra 21-1	OGT	CEA	ENO2	TG	CALCA	NSE	SCC	TPA	AFP	CGB
500	0.041	0.041	0.039	0.041	0.04	0.04	0.041	0.041	0.041	0.044	0.042	0.044
650	0.04	0.044	0.04	0.04	0.041	0.04	0.039	0.043	0.041	0.045	0.046	0.044
O.D	-0.001	0.003	0.001	-0.001	0.001	0	-0.002	0.002	0	0.001	0.004	0

CA19-9	CA125	CA15-3	HER2	TOP2A	MCM2	CDKN2A	Ki-67	HE4	HIF-1a	VEGF	PC
0.042	0.04	0.041	0.041	0.041	0.043	0.041	0.042	0.042	0.042	0.042	0.054
0.04	0.039	0.044	0.039	0.04	0.042	0.043	0.042	0.044	0.045	0.042	0.08
-0.002	-0.001	0.003	-0.002	-0.001	-0.001	0.002	0	0.002	0.003	0	0.026

正常 sub. #2 (F/)

波長	NMP22	Cyfra 21-1	OGT	CEA	ENO2	TG	CALCA	NSE	SCC	TPA	AFP	CGB
500	0.046	0.041	0.04	0.042	0.043	0.043	0.042	0.041	0.041	0.042	0.043	0.041
650	0.05	0.044	0.042	0.043	0.047	0.045	0.045	0.043	0.042	0.044	0.043	0.039
O.D	0.004	0.003	0.002	0.001	0.004	0.002	0.003	0.002	0.001	0.002	0	-0.002

CA19-9	CA125	CA15-3	HER2	TOP2A	MCM2	CDKN2A	Ki-67	HE4	HIF-1a	VEGF	PC
0.041	0.041	0.041	0.041	0.042	0.041	0.043	0.046	0.042	0.043	0.043	0.052
0.042	0.041	0.041	0.044	0.042	0.042	0.045	0.051	0.043	0.043	0.043	0.089
0.001	0	0	0.003	0	0.001	0.002	0.005	0.001	0	0	0.037

【圖150】

肺癌	癌症標記	說明
	NSE	神經元特異性烯醇酶
	SCC	鱗狀細胞癌
	CEA	癌胚抗原
	Cyfra21-1	細胞角質蛋白19片段
	TPA	組織胜肽抗原

膀胱癌	癌症標記	說明
	NMP22	核基質蛋白22
	Cyfra21-1	細胞角質蛋白19片段
	OGT	O-連結型N-乙醯基葡萄糖胺(GlcNAc) 轉移酶
	CEA	癌胚抗原

甲狀腺癌	癌症標記	說明
	CEA	癌胚抗原
	NSE	神經元特異性烯醇酶
	甲狀腺球蛋白(TG)	甲狀腺球蛋白
	抑鈣素(CALCA)	抑鈣素蛋白
	BRAF V600E	*BRAF*基因的突變
	TERT C228T, C250T	*TERT*基因的突變

肝癌	癌症標記	說明
	CEA	癌胚抗原
	AFP	甲型胎兒蛋白

胃癌	癌症標記	說明
	CEA	癌胚抗原
	Cyfra21-1	細胞角質蛋白19片段
	β-HCG (CGB)	人類絨毛膜促性腺激素
	CA19-9	碳水化合物抗原 19-9

前列腺癌	癌症標記	說明
	PSA	前列腺特異性抗原
	PSMA	前列腺特異性膜抗原
	PAP	前列腺酸性磷酸酶
	PCA3	前列腺癌抗原3
	TMPRSS2-ERG	*TMPRSS2-ERG* 基因融合

腎癌	癌症標記	說明
	HIF-1a	缺氧誘導因子1-α
	VEGF	血管內皮生長因子

【圖151】

膽管癌	癌症標記	說明
	CEA	癌胚抗原
	CA19-9	碳水化合物抗原 19-9
	CA125	癌症抗原 125

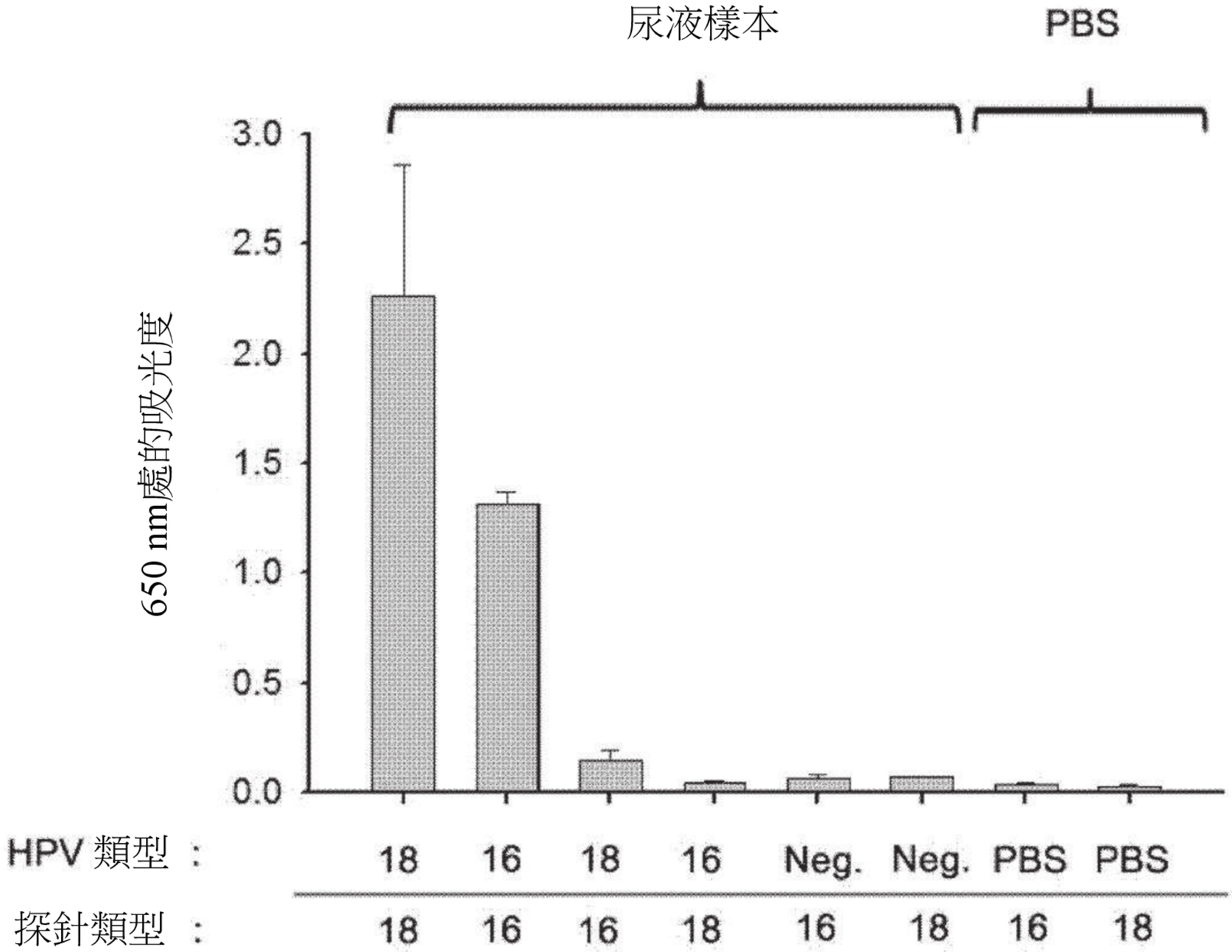
大腸癌/胰臟癌	癌症標記	說明
	CEA	癌胚抗原
	CA19-9	碳水化合物抗原 19-9

卵巢癌	癌症標記	說明
	CEA	癌胚抗原
	CA125	癌症抗原 125
	CA15-3	癌症抗原 15-3
	AFP	人類表皮生長因子受體 2
	HE4 (WFDC2)	人類副睪蛋白 4

乳癌	癌症標記	說明
	CEA	癌胚抗原
	CA125	癌症抗原 125
	CA15-3	癌症抗原 15-3
	HER2	人類表皮生長因子受體 2

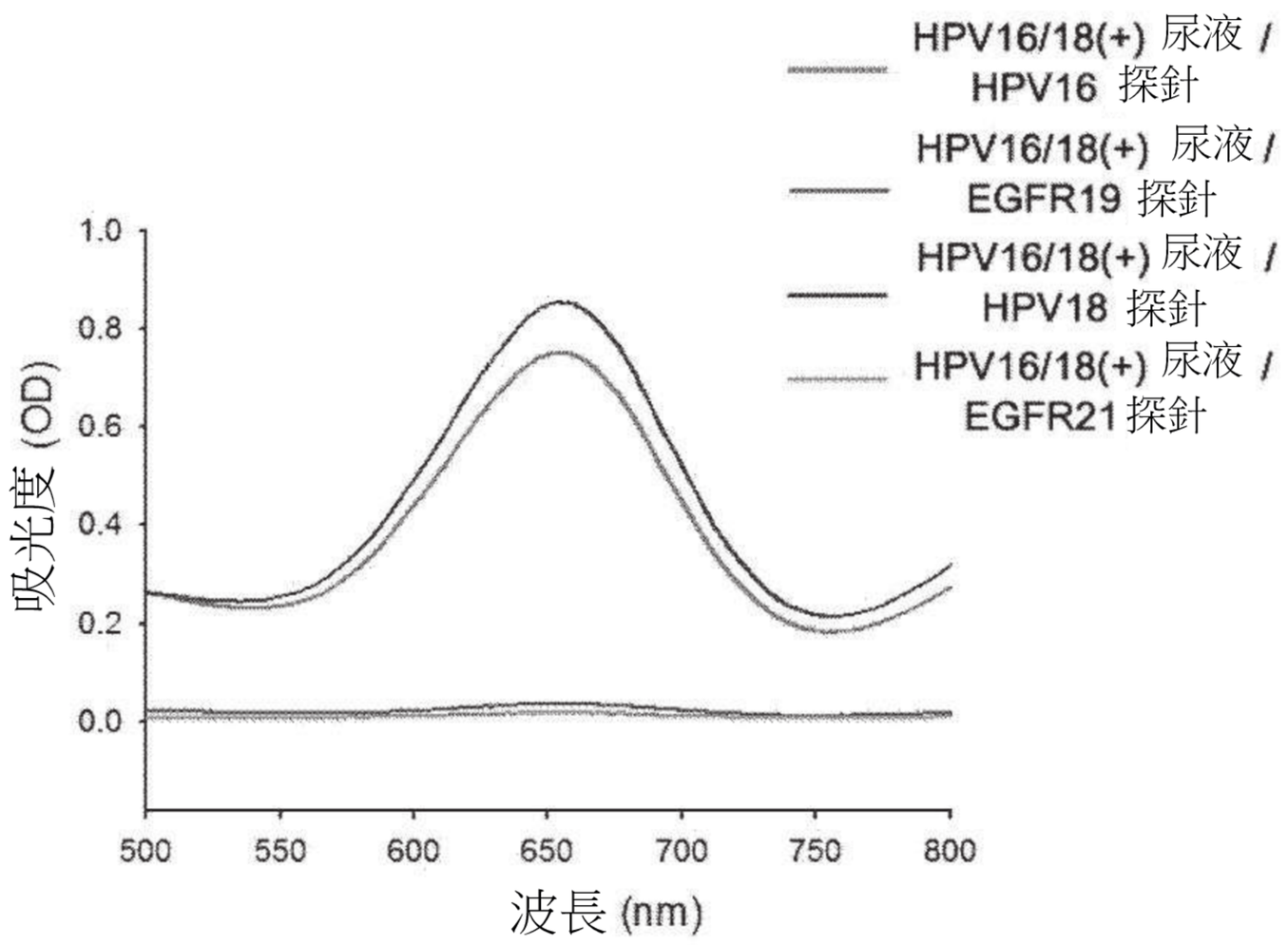
子宮頸癌	癌症標記	說明
	CEA	癌胚抗原
	SCC (SART3)	鱗狀細胞癌
	TOP2A	拓樸異構酶II α
	MCM2	微小染色體維持蛋白 2
	p16INK4a (CDKN2A)	細胞週期蛋白依賴性激酶抑制劑 2A
	Ki-67 (MKI67)	抗原 KI-67

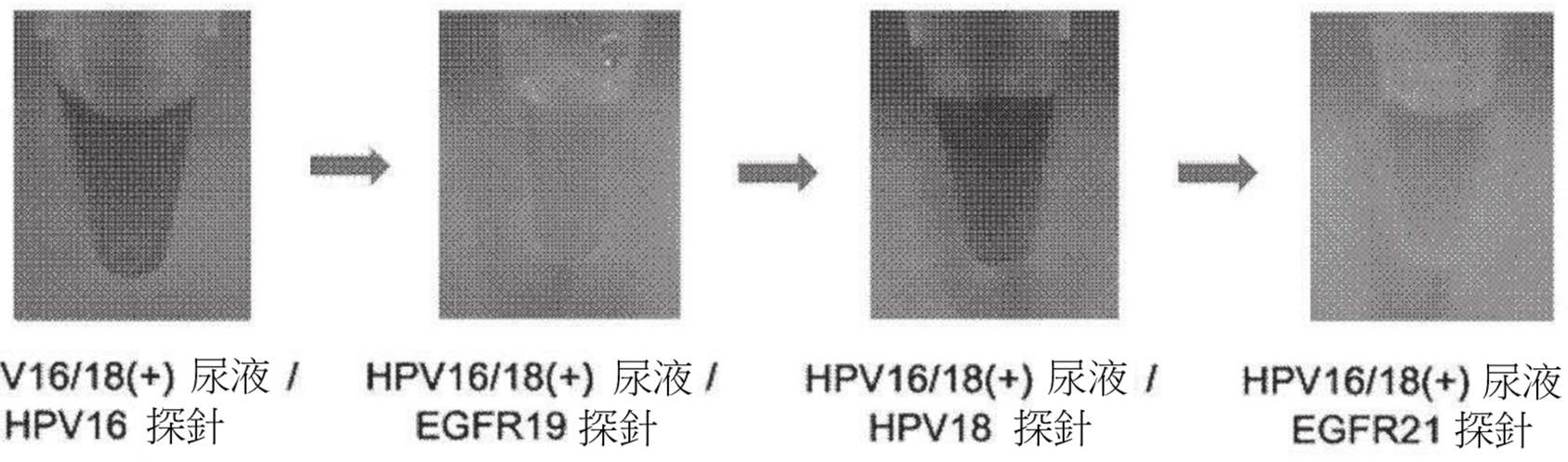
【圖152】



【圖153】

B

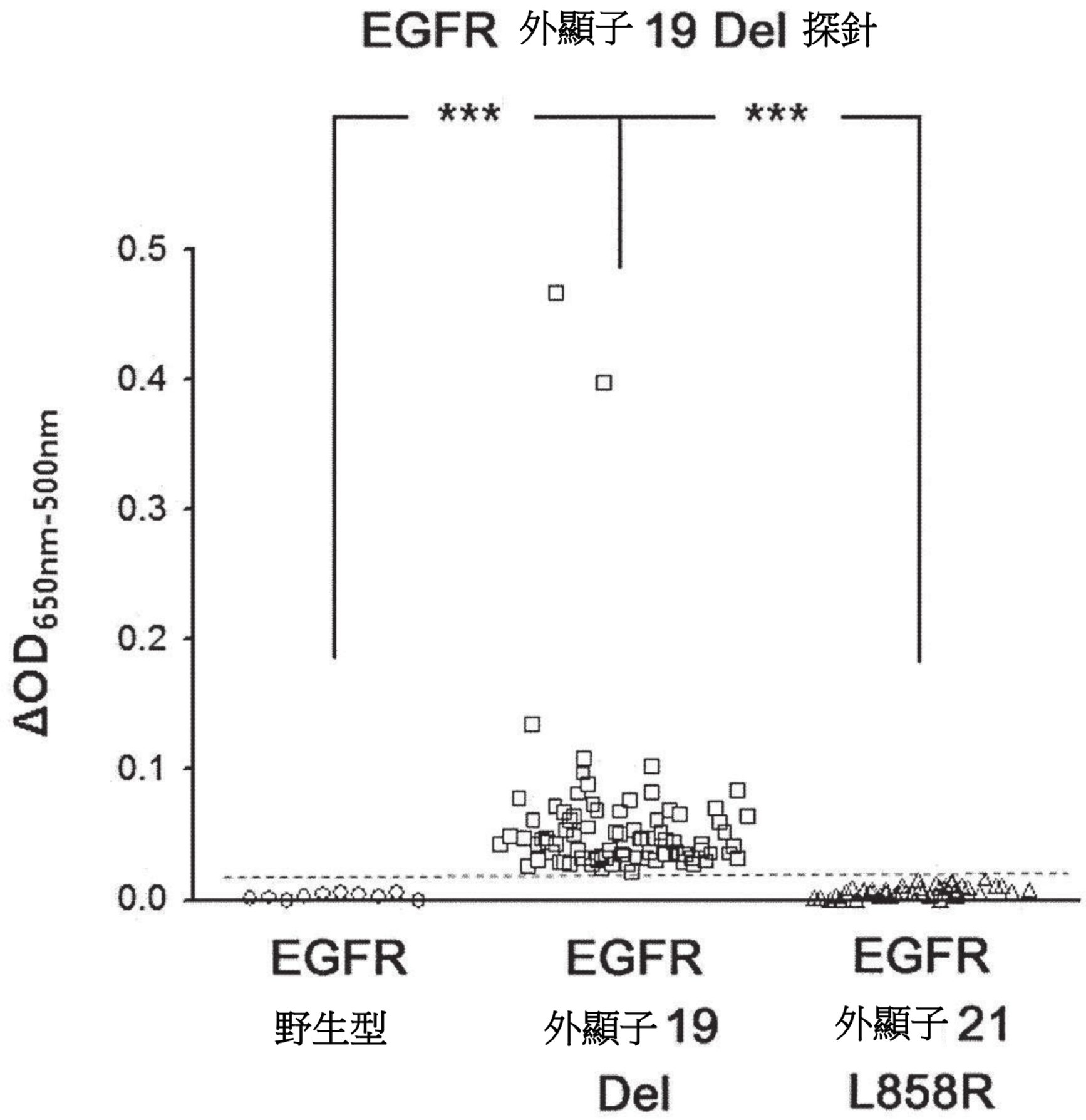

HPV16/18(+) 尿液 / HPV16 探針
HPV16/18(+) 尿液 / EGFR19 探針
HPV16/18(+) 尿液 / HPV18 探針
HPV16/18(+) 尿液 / EGFR21 探針
吸光度 (OD)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
500
550
600
650
700
750
800
波長 (nm)


HPV16/18(+) 尿液 / HPV16 探針
HPV16/18(+) 尿液 / EGFR19 探針
HPV16/18(+) 尿液 / HPV18 探針
HPV16/18(+) 尿液 / EGFR21 探針

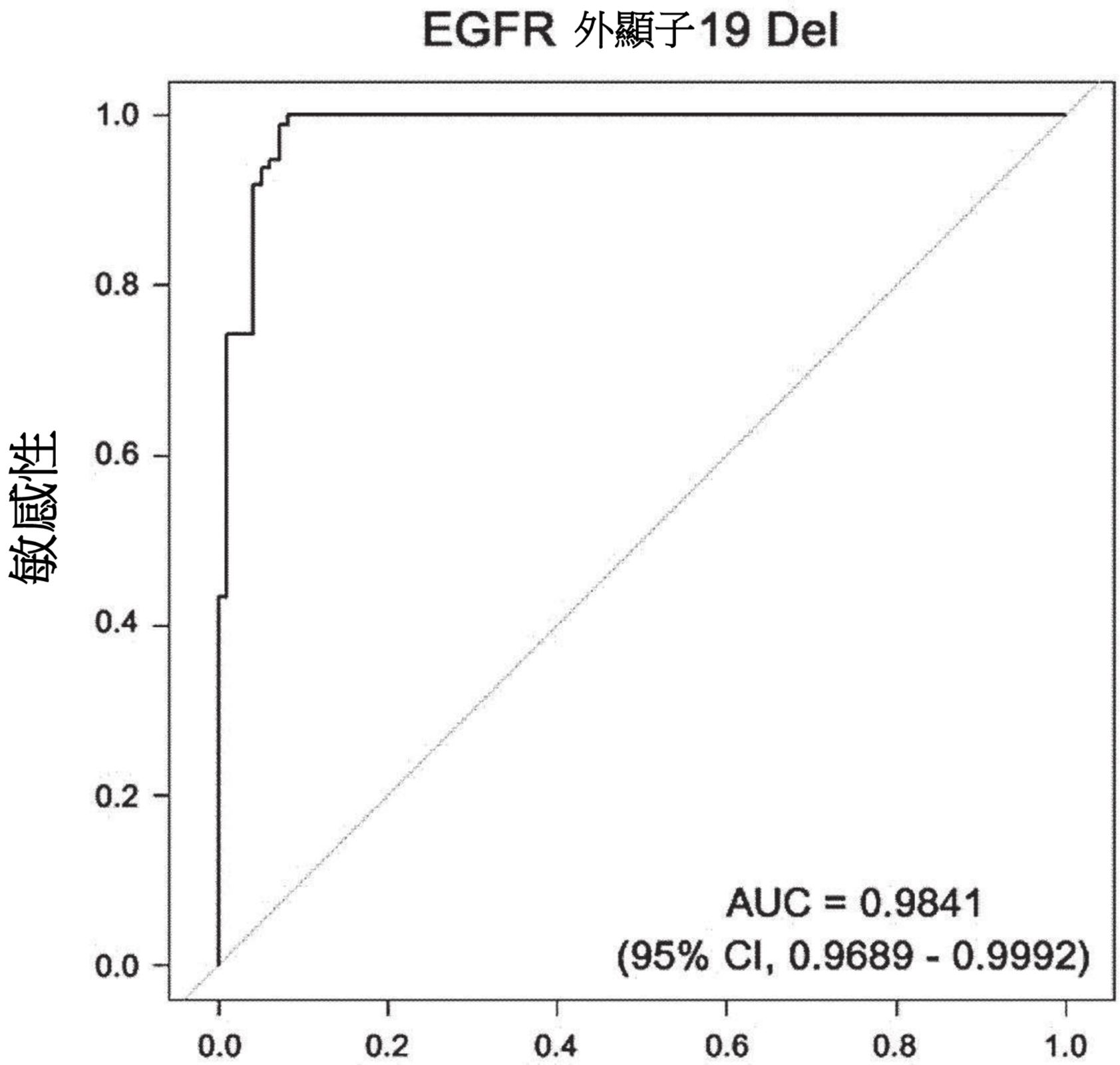
【圖154】

	總計 [N = 151], n (%)
年齡，歲：	
平均	61
範圍	38 - 84
性別：	
男性	67 (44.4)
女性	84 (55.6)
臨床階段：	
IIA - IIIA	6 (4)
IIIB - IV	145 (96)
突變類型：	
野生型	10 (6.6)
外顯子 19 Del	92 (60.9)
外顯子 21 L858R	49 (32.5)

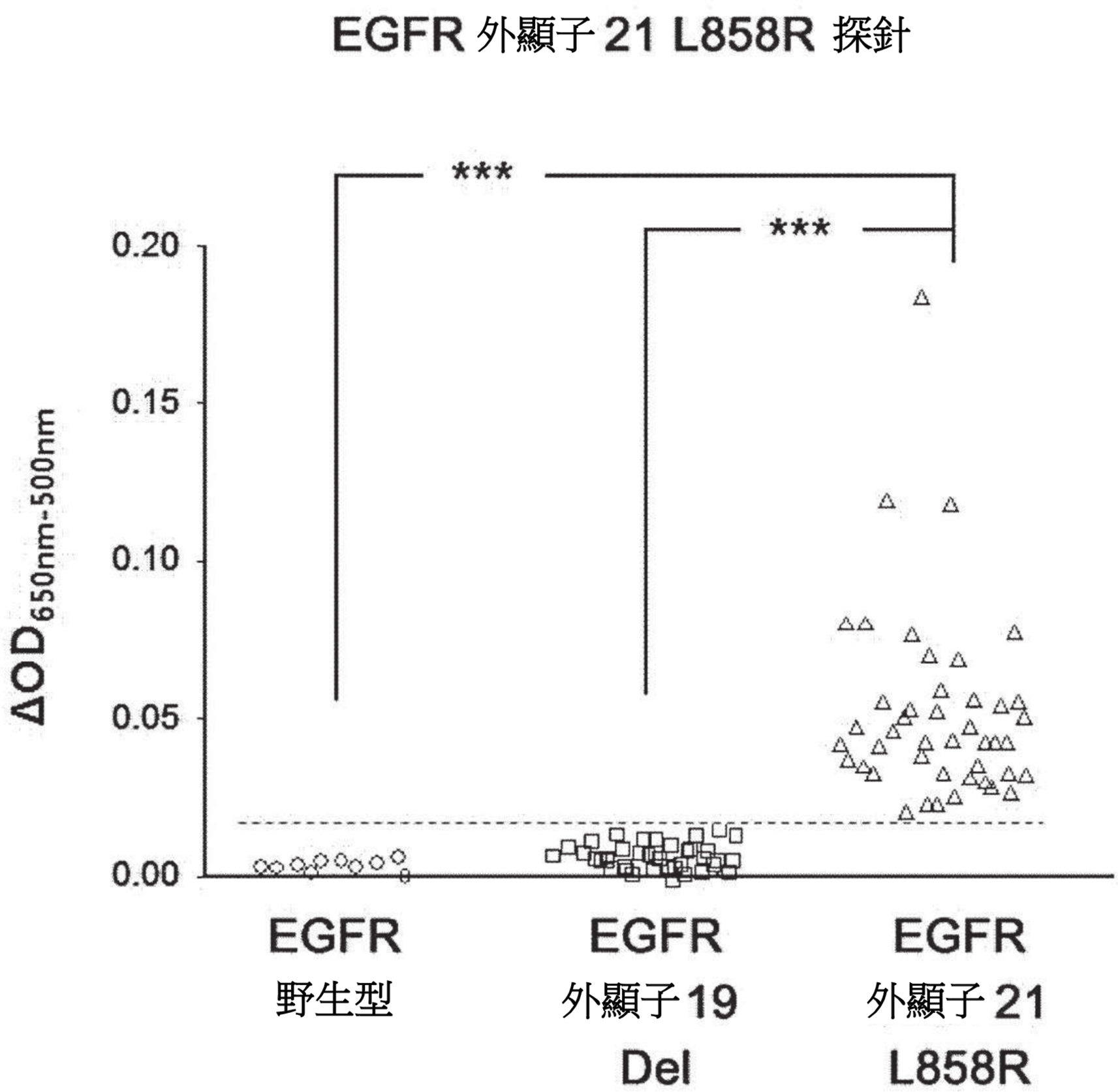
【圖155】


EGFR 外顯子 19 Del 探針
***
***
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
ΔOD650nm-500nm
EGFR
野生型
EGFR
外顯子 19
Del
EGFR
外顯子 21
L858R

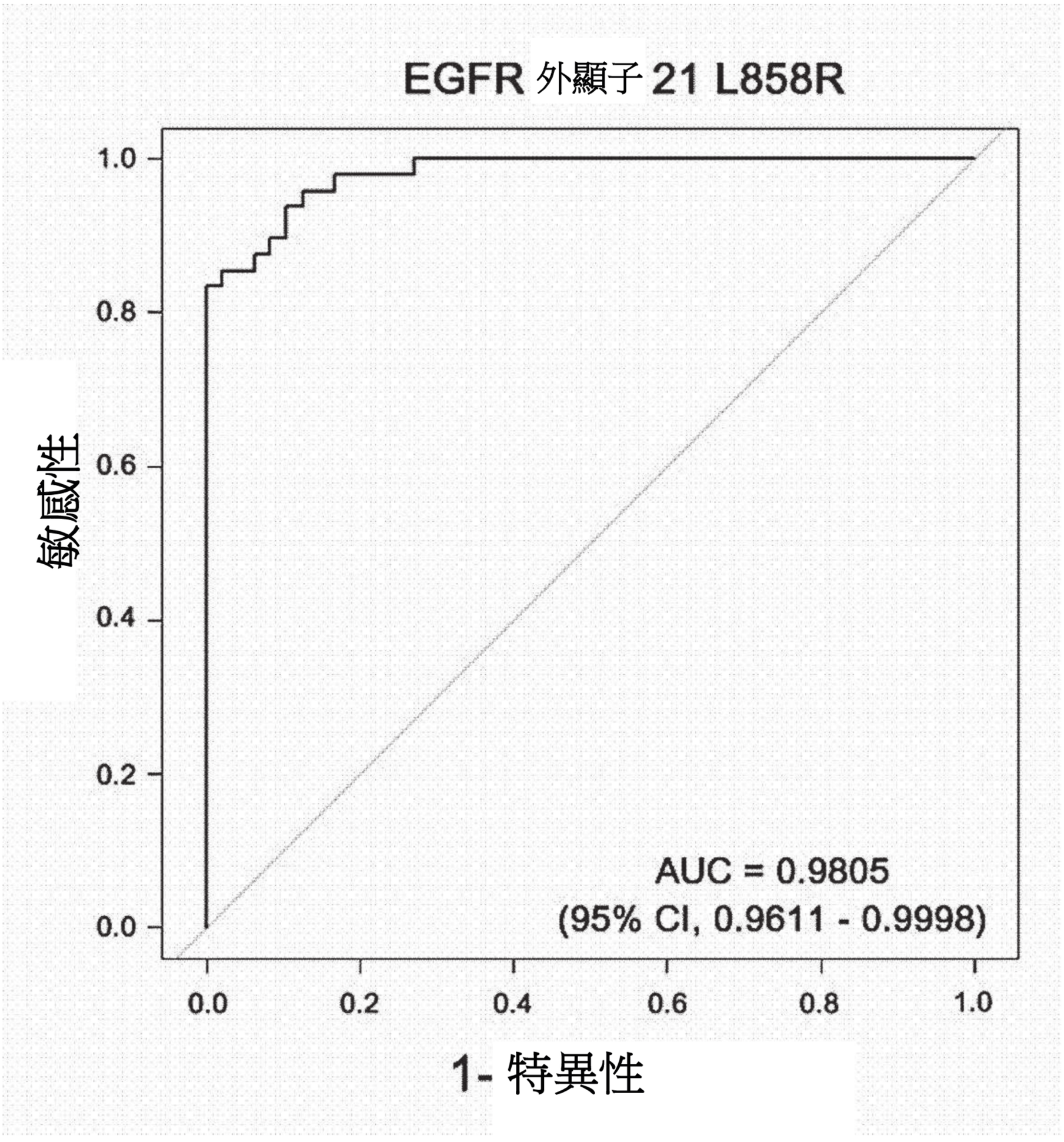
【圖156】


EGFR 外顯子19 Del
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
敏感性
AUC = 0.9841
(95% CI, 0.9689 - 0.9992)
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1- 特異性

【圖157】


EGFR 外顯子 21 L858R 探針
***
***
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
ΔOD650nm-500nm
EGFR
野生型
EGFR
外顯子19
Del
EGFR
外顯子21
L858R

【圖158】


EGFR 外顯子 21 L858R
敏感性
1- 特異性
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
AUC = 0.9805
(95% CI, 0.9611 - 0.9998)

【圖159】

EGFR 外顯子19缺失

A
外顯子19
gcagcatgtggcaccatctcacaattgccagttaacgtcttccttctctctctgtcatag
740
G L W I P E G E K V K I P V A I K
GGA CTC TGG ATC CCA GAA GGT GAG AAA GTT AAA ATT CCC GTC GCT ATC AAG
746 750 760
E L R E A T S P K A N K E I L D (SEQ ID NO: 148)
GAA TTA AGA GAA GCA ACA TCT CCG AAA GCC AAC AAG GAA ATC CTC GAT
gtgagtttctgctttgctgtgtgggggtccatggctctgaacctcaggcccacctttttct (SEQ ID NO: 149)

CP_1: 5′-Biotin-GGAATTAAGAGAAGCAACATCTCC-3′ (SEQ ID NO: 150)
DP: 5′-AAA AGG TGG GCC TGA GGT T-Biotin-3′ (SEQ ID NO: 151)

CP_2: 5′-Biotin-AAAATTCCCGTCGCTATCAAG-3′ (SEQ ID NO: 152)
DP: 5′-AAA AGG TGG GCC TGA GGT T-Biotin-3′

CP_3: 5′-Biotin-GGACTCTGGATCCCAGAAGGTGAG-3′ (SEQ ID NO: 153)
DP : 5′-AAA AGG TGG GCC TGA GGT T-Biotin-3′

要使用的探針

外顯子19缺失區

cactgggcagcatgtggcaccatctcacaattgccagttaacgtcttcct
tctctctctgtcatagGGACTCTGGATCCCAGAAGGTGAGAAAGTTAAAA
TTCCCGTCGCTATCAAGGAATTAAGAGAAGCAACATCTCCGAAAGCCAAC
AAGGAAATCCTCGATgtgagtttctgctttgctgtgtgggggtccatggc
tctgaacctcaggcccacctttttctcatgtctggcagctgctctgctcta
gaccctgctcatctccacatcctaaatgttcactttctatgtctttccct
tt (SEQ ID NO: 154)

【圖160】

EGFR 外顯子20 T790M

ACG (WT, T)
ATG (T790M, M)

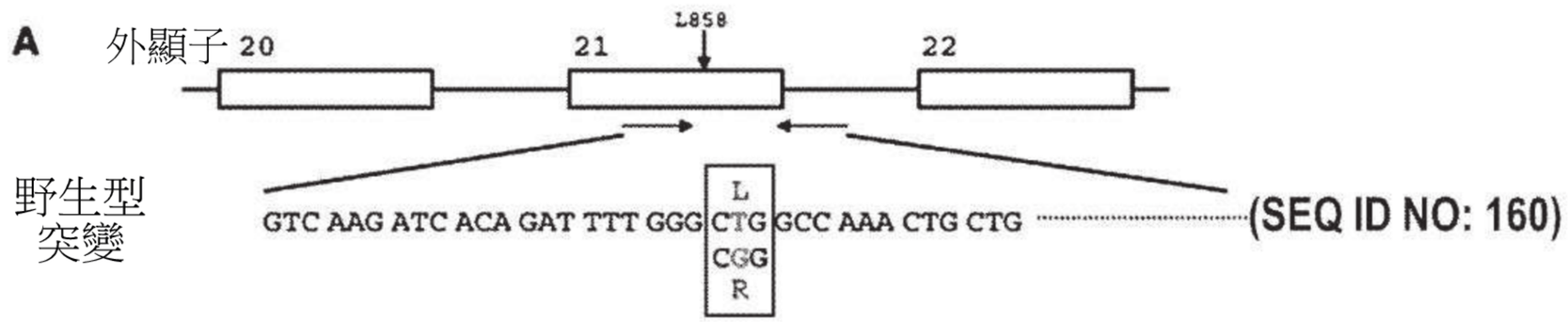
ccagatgcacccaggaggggccctctcccactgcatctgtcacttcacag
ccctgcgtaaacgtccctgtgctaggtcttttgcaggcacagcttttcct
ccatgagtacgtattttgaaactcaagatcgcattcatgcgtcttcacct
ggaaggggtccatgtgcccctccttctggccaccatgcgaagccacactg
acgtgcctctccctccctccag
GAAGCCTACGTGATGGCCAGCGTGGACAACCCCCACGTGTGCCGCCTGCT
GGGCATCTGCCTCACCTCCACCGTGCAGCTCATCACGCAGCTCATGCCCT
TCGGCTGCCTCCTGGACTATGTCCGGGAACACAAAGACAATATTGGCTCC
CAGTACCTGCTCAACTGGTGTGTGCAGATCGCAAAG
gtaatcagggaagggagatacggggaggggagataaggagccaggatcct
cacatgcggtctgcgctcctgggatagcaagagtttgccatggggatatg
tgtgtgcgtgcatgcagcacacacacattcctttattttggattcaatca
agttgatcttcttgtgcacaaatcagtgcctgtcccatctgcatgtggaa
actctcatcaatcagctacctttgaagaattttctctttattgagtgctc
(SEQ ID NO: 155)

CP1: 5′-Biotin-CCATGAGTACGTATTTTGAAACTC-3′	**(SEQ ID NO: 156)**
DP: 5′-cat atc ccc atg gca aac tct tgc-Biotin-**3′**	**(SEQ ID NO: 157)**
CP2: 5′-Biotin-CCACCGTGCAGCTCATCATGCA-3′	**(SEQ ID NO: 158)** → 要使用的探針
DP: 5′-cat atc ccc atg gca aac tct tgc-Biotin-**3′**	
CP3: 5′-Biotin-GAAGCCTACGTGATGGCCAGCGT-3′	**(SEQ ID NO: 159)**
DP: 5′-cat atc ccc atg gca aac tct tgc-Biotin-**3′**	

【圖161】

EGFR外顯子21 L858R

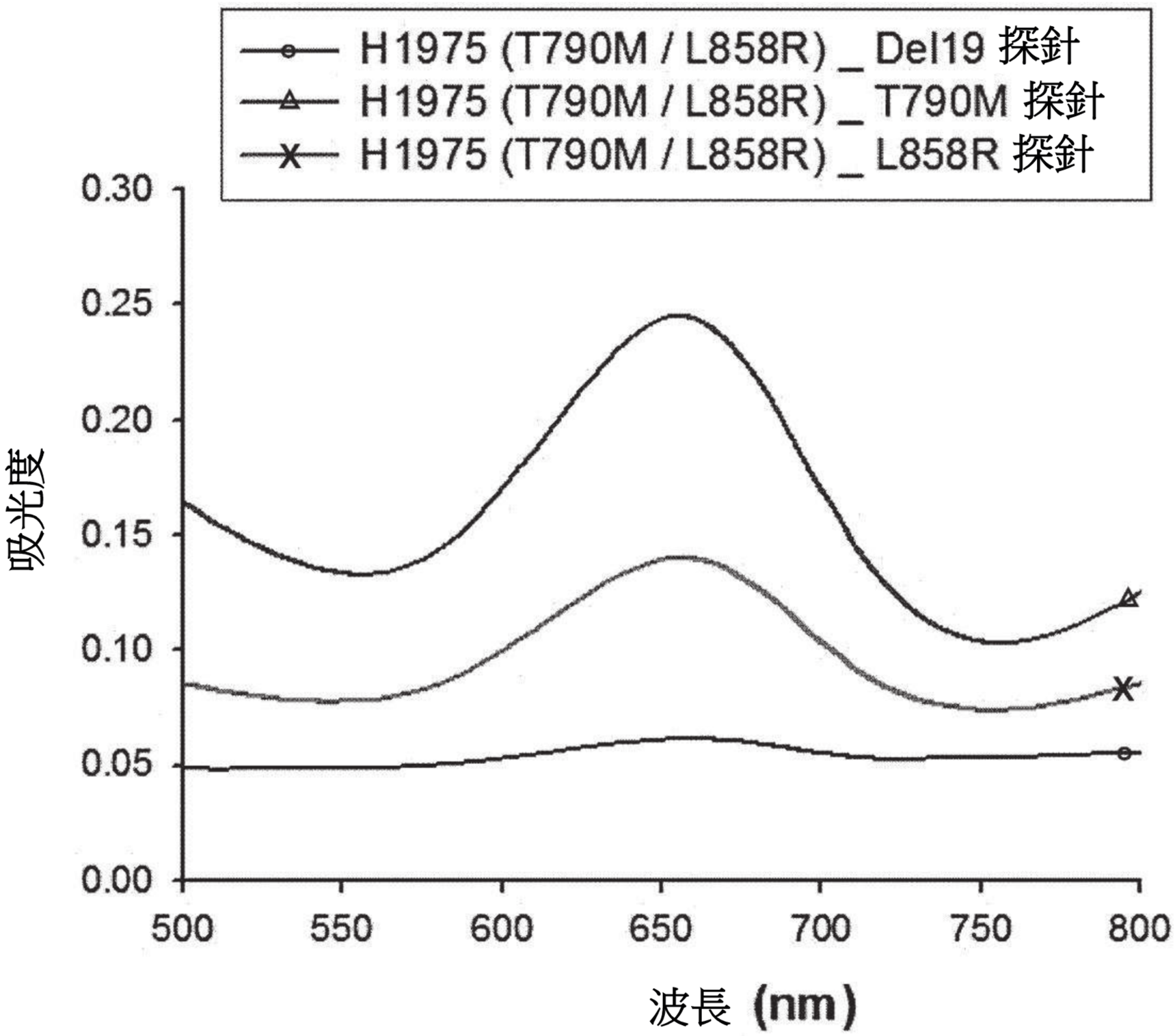
CTG (WT, L)
CGG(L858R, R)

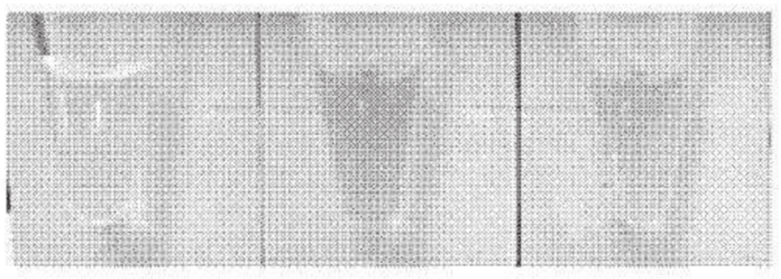


GGCATGAACTACTTGGAGGACCGTCGCTTGGTGCACCGCGACCTGGCAGCCAGGAACG
TACTGGTGAAAACACCGCAGCATGTCAAGATCACAGATTTTGGGCTGGCCAAACTGCT
GGGTGCGGAAGAGAAAGAATACCATGCAGAAGGA GGCAAA (SEQ ID NO: 161)

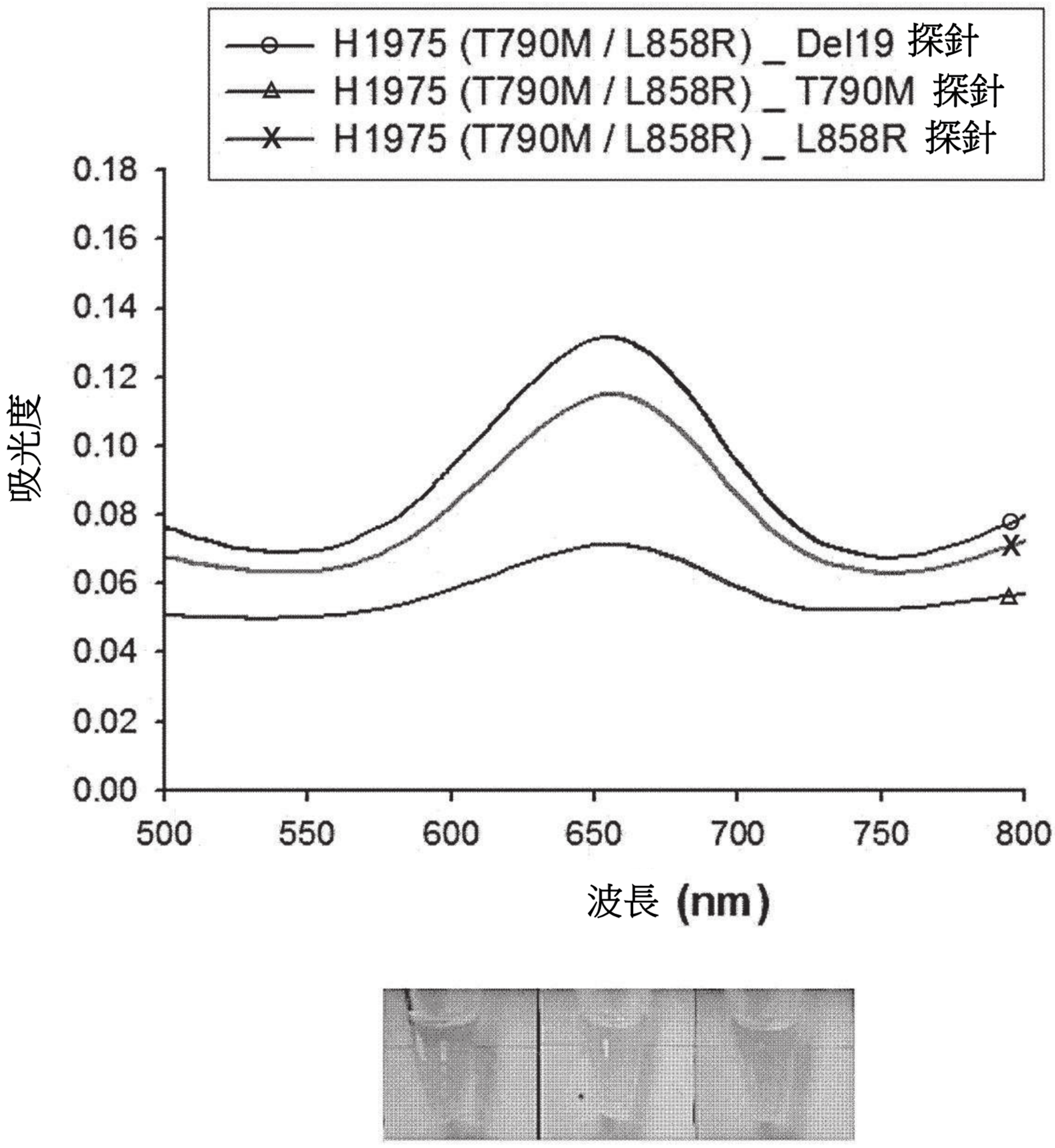
Cp1: CCAGGAGCGTACTGGTGAAAA	(SEQ ID NO: 162)
DP : GGAAGAGAAAGAATACCATGCA	(SEQ ID NO: 163)
Cp2: AAG ATC ACA GAT TTT GGG CGG G	(SEQ ID NO: 164) → 要使用的探針
DP : GGAAGAGAAAGAATACCATGCA	
Cp3: GGC ATG AAC TAC TTG GAG GAC CGT	(SEQ ID NO: 165)
DP : GGAAGAGAAAGAATACCATGCA	

【圖162】

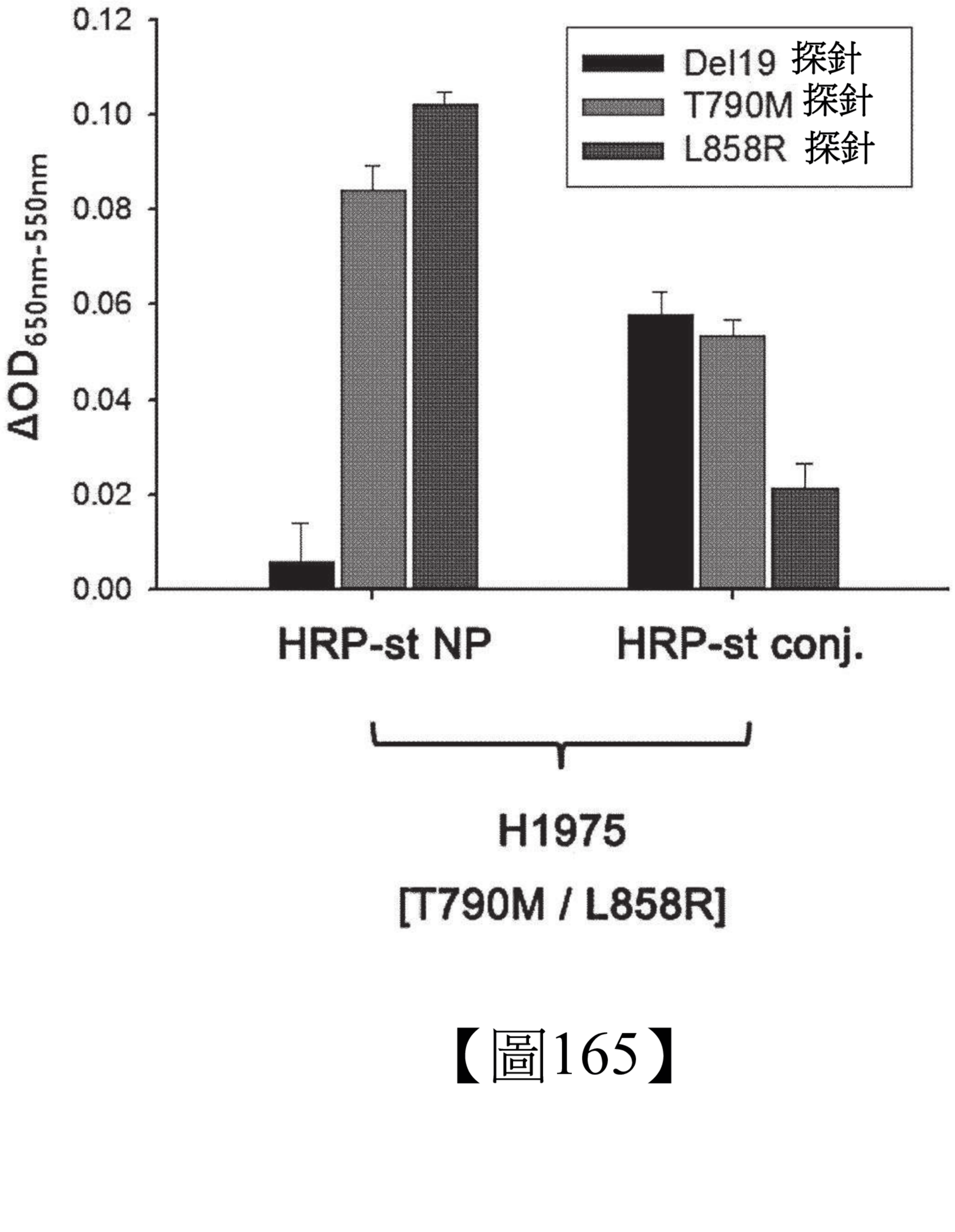

H1975 (T790M / L858R) _ Del19 探針
H1975 (T790M / L858R) _ T790M 探針
H1975 (T790M / L858R) _ L858R 探針
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
吸光度
500
550
600
650
700
750
800
波長 (nm)


EGFR 探針 ：
Del19
T790M
L858R

【圖163】


H1975 (T790M / L858R) _ Del19 探針
H1975 (T790M / L858R) _ T790M 探針
H1975 (T790M / L858R) _ L858R 探針
吸光度
0.18
0.16
0.14
0.12
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
500
550
600
650
700
750
800
波長 (nm)
EGFR 探針 :
Del19
T790M
L858R

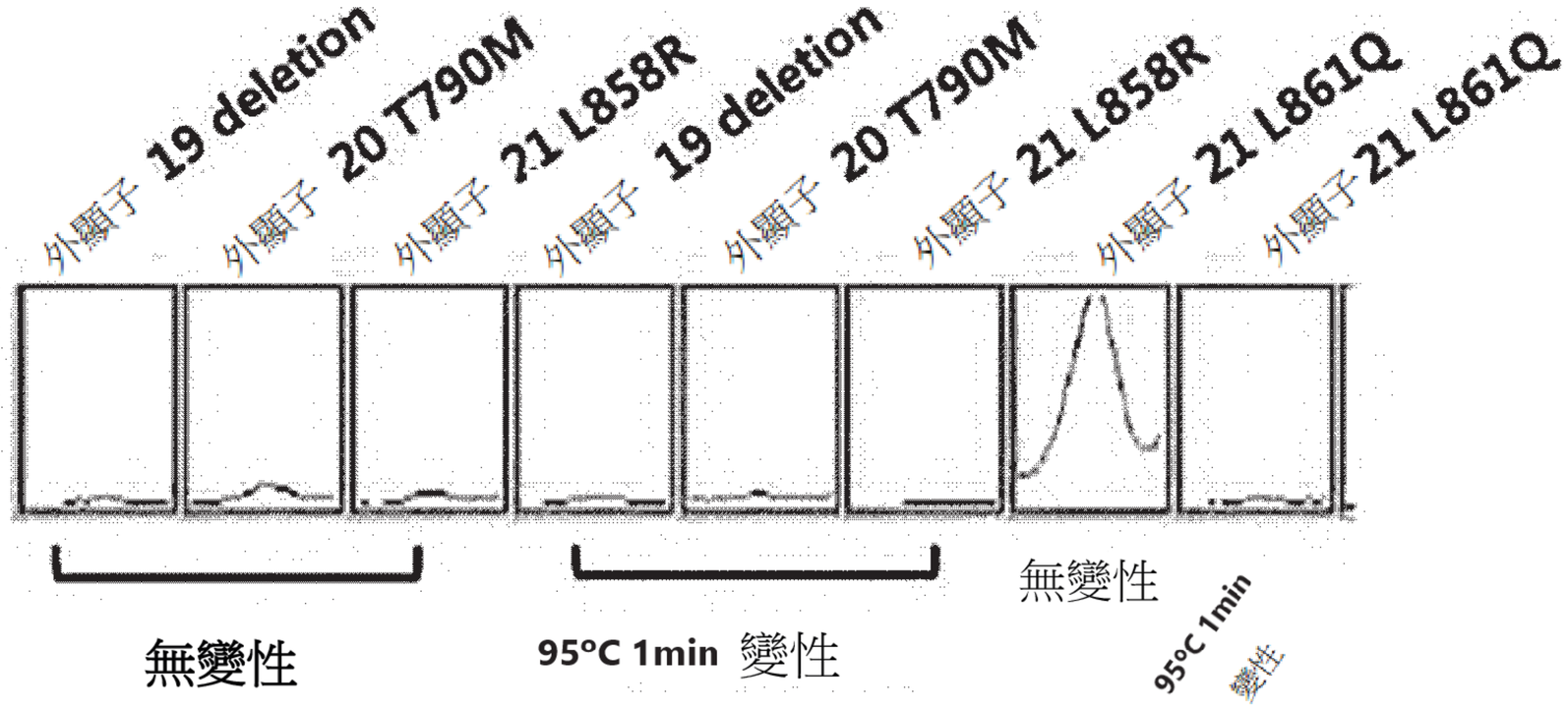
【圖164】


0.12
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
ΔOD650nm-550nm
Del19 探針
T790M 探針
L858R 探針
HRP-st NP
HRP-st conj.
H1975
[T790M / L858R]

【圖165】

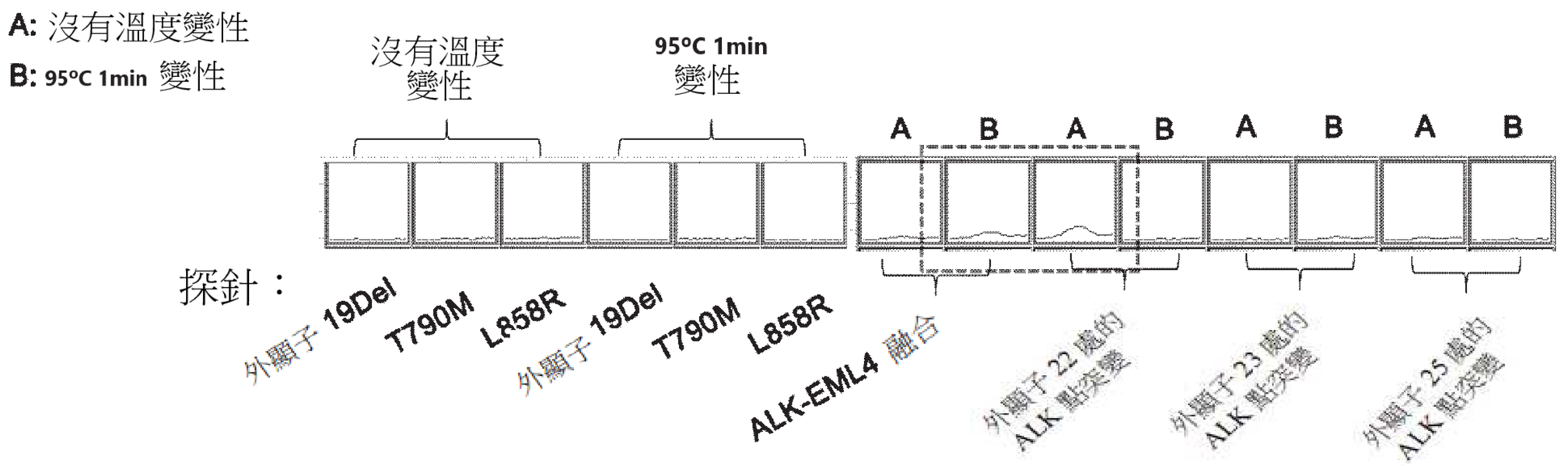
患者組織切片活檢 ：EGFR外顯子20 T790M / 21 L861Q

血漿 cfDNA 結果 ：EGFR外顯子20 T790M / 21 L861Q



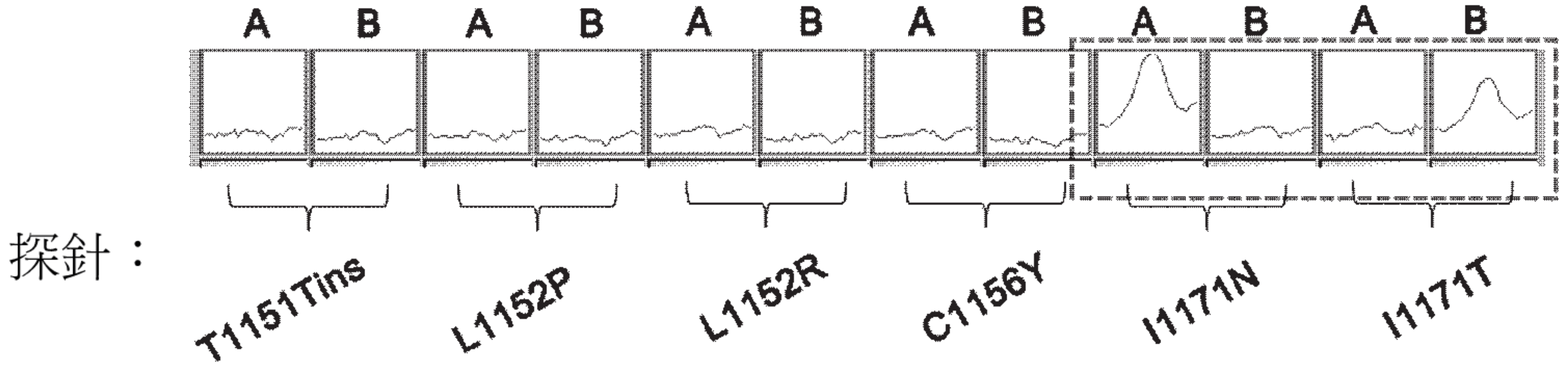
EGFR 突變	Δ OD (650 nm – 500nm)
外顯子19缺失，無變性	0.0115
外顯子20 T790M, 無變性	0.0191
外顯子21 L858R, 無變性	0.0145
外顯子19 deletion, 95°C 1min 變性	0.0111
外顯子20 T790M, 95°C 1min 變性	0.0081
外顯子21 L858R, 95°C 1min 變性	0.0046
外顯子21 L861Q, 無變性	0.2189
外顯子21 L861Q, 95°C 1min 變性	0.0102

【圖166】



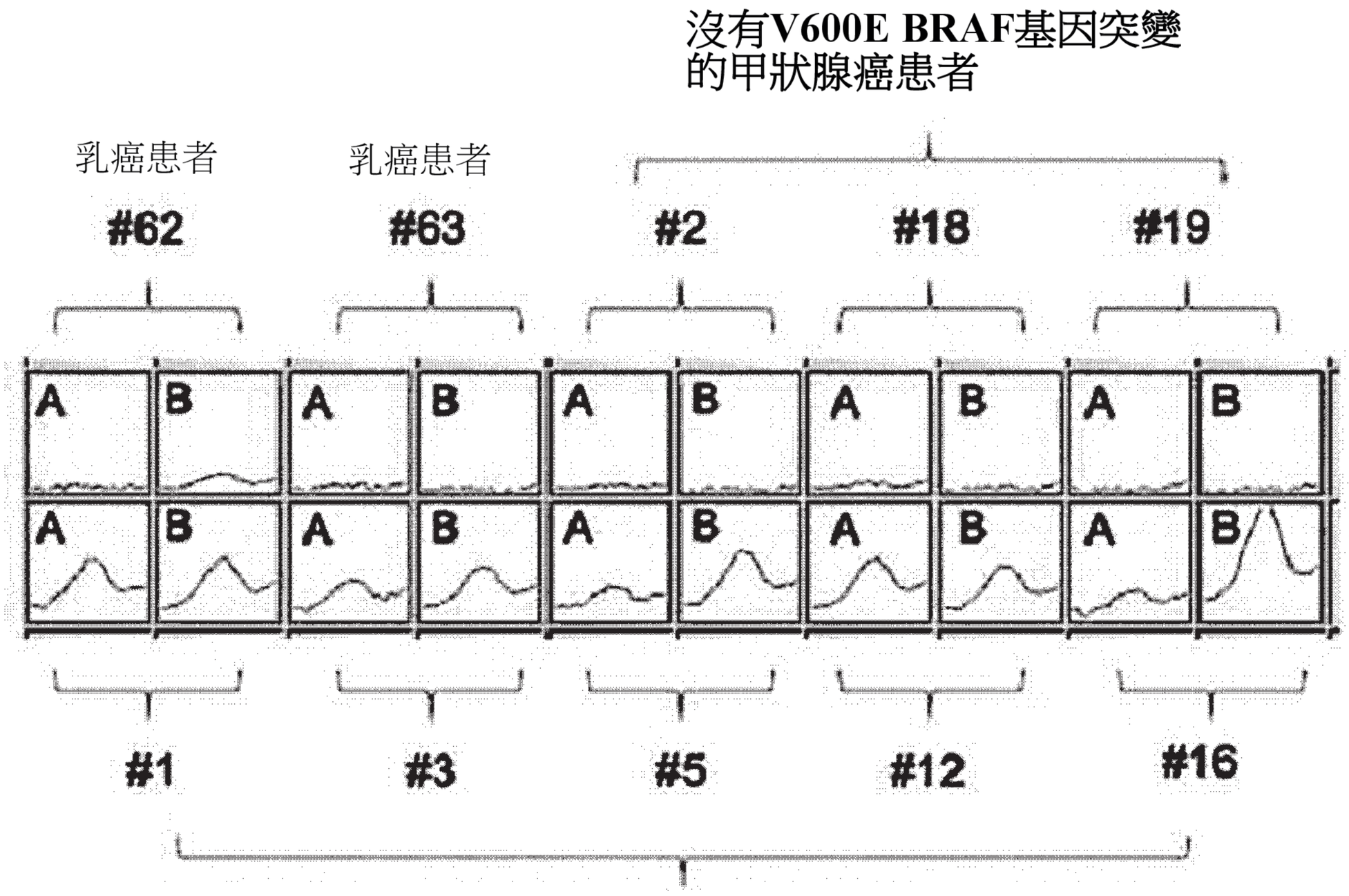
	500	650	
E19, 27	0.0329	0.0353	0.0024
E20, 27	0.0344	0.0379	0.0035
E21, 27	0.0364	0.0394	0.003
E19, 95	0.0335	0.0338	0.0003
E20, 95	0.036	0.0366	0.0006
E21, 95	0.0321	0.0325	0.0004
ALK, 27	0.0323	0.0446	0.0123
ALK, 95	0.0387	0.0549	0.0162
ALK E22, 27	0.0381	0.0715	0.0334
ALK E22, 95	0.0319	0.0377	0.0058
ALK E23, 27	0.0324	0.0369	0.0045
ALK E23, 95	0.0326	0.0431	0.0105
ALK E25, 27	0.0339	0.0395	0.0056
ALK E25, 95	0.032	0.0363	0.0043

外顯子22處的ALK點突變



	500nm	650nm	
T1151, 27	0.0734	0.0751	0.0017
T1151, 95	0.0713	0.0744	0.0031
L1152P, 27	0.074	0.0735	-0.0005
L1152P, 95	0.0722	0.0713	-0.0009
L1152R, 27	0.0729	0.0777	0.0048
L1152R, 95	0.0725	0.0731	0.0006
C1156Y, 27	0.0731	0.0748	0.0017
C1156Y, 95	0.0721	0.071	-0.0011
I1171N, 27	0.0767	0.107	0.0303
I1171N, 95	0.0732	0.0767	0.0035
I1171T, 27	0.0734	0.0781	0.0047
I1171T, 95	0.075	0.0968	0.0218

【圖167】



具有V600E BRAF基因突變的甲狀腺癌患者
在其癌症組織已確認

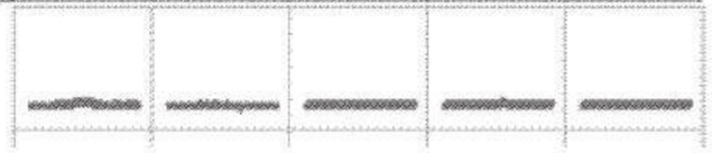
A: 沒有溫度變性

B: 95°C 1min 變性

【圖168】

無變性

WAV	E19del	T790M	C797S	L858R	L861Q
500	0.039	0.04	0.038	0.04	0.04
650	0.04	0.039	0.039	0.039	0.039
Δ O.D.	0.001	-0.001	0	-0.001	-0.001
N- 計分	0.03	-0.03	0	-0.03	-0.03



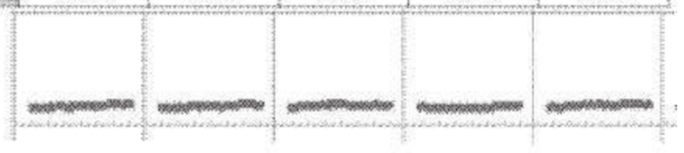
在30℃變性5 min

WAV	E19del	T790M	C797S	L858R	L861Q
500	0.039	0.04	0.038	0.04	0.04
650	0.04	0.041	0.039	0.042	0.039
Δ O.D.	0.001	0.001	0.001	0.002	-0.001
N- 計分	0.03	0.03	0.03	0.06	-0.03



在30℃變性15 min

WAV	E19del	T790M	C797S	L858R	L861Q
500	0.038	0.038	0.038	0.038	0.038
650	0.041	0.04	0.041	0.038	0.041
Δ O.D.	0.003	0.002	0.003	0	0.003
N- 計分	0.09	0.06	0.09	0.00	0.09



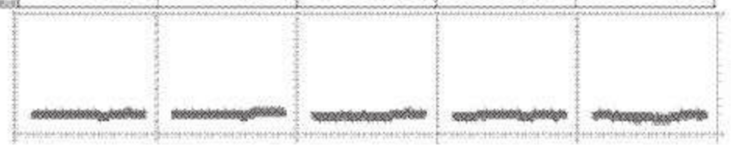
在60℃變性1 min 30 sec

WAV	E19del	T790M	C797S	L858R	L861Q
500	0.039	0.04	0.04	0.038	0.038
650	0.039	0.042	0.04	0.039	0.039
Δ O.D.	0	0.002	0	0.001	0.001
N- 計分	0.00	0.06	0.00	0.03	0.03



在60℃變性5 min

WAV	E19del	T790M	C797S	L858R	L861Q
500	0.039	0.04	0.038	0.038	0.038
650	0.04	0.04	0.038	0.04	0.037
Δ O.D.	0.001	0	0	0.002	-0.001
N-計分	0.03	0.00	0.00	0.06	-0.03



在95℃變性1 min

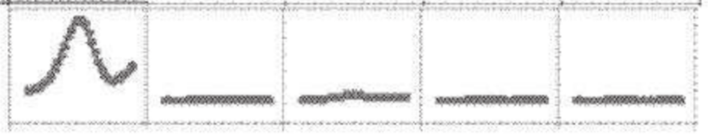
WAV	E19del	T790M	C797S	L858R	L861Q
500	0.039	0.04	0.038	0.04	0.04
650	0.039	0.039	0.039	0.039	0.039
Δ O.D.	0	-0.001	0	-0.001	-0.001
N- 計分	0	-0.03	0	-0.03	-0.03



【圖169】

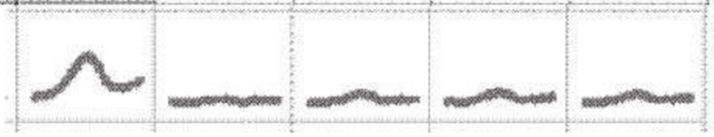
無變性

WAV	E19del	T790M	C797S	L858R	L861Q
500	0.047	0.039	0.04	0.039	0.039
650	0.107	0.04	0.042	0.04	0.04
Δ O.D.	0.06	0.001	0.002	0.001	0.001
N- 計分	1.88	0.03	0.06	0.03	0.03



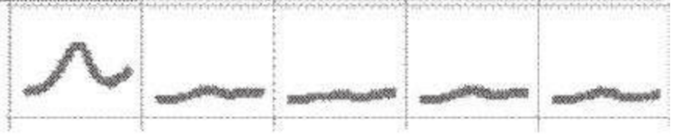
在30℃變性5 min

WAV	E19del	T790M	C797S	L858R	L861Q
500	0.044	0.04	0.039	0.04	0.04
650	0.077	0.042	0.047	0.049	0.046
Δ O.D.	0.033	0.002	0.008	0.009	0.006
N- 計分	1.03	0.06	0.25	0.28	0.19



在30℃變性15 min

WAV	E19del	T790M	C797S	L858R	L861Q
500	0.046	0.04	0.04	0.04	0.039
650	0.083	0.047	0.044	0.047	0.045
Δ O.D.	0.037	0.007	0.004	0.007	0.006
N- 計分	1.16	0.22	0.13	0.22	0.19



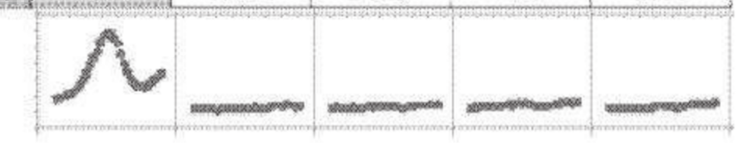
在60℃變性1 min 30 sec

WAV	E19del	T790M	C797S	L858R	L861Q
500	0.042	0.039	0.039	0.039	0.04
650	0.071	0.049	0.045	0.043	0.044
Δ O.D.	0.029	0.01	0.006	0.004	0.004
N- 計分	0.91	0.31	0.19	0.13	0.13



在60℃變性5 min

WAV	E19del	T790M	C797S	L858R	L861Q
500	0.047	0.039	0.04	0.04	0.04
650	0.1	0.04	0.042	0.044	0.043
Δ O.D.	0.053	0.001	0.002	0.004	0.003
N- 計分	1.66	0.03	0.06	0.13	0.09



在95℃變性1 min

WAV	E19del	T790M	C797S	L858R	L861Q
500	0.042	0.039	0.039	0.039	0.039
650	0.069	0.04	0.04	0.04	0.04
Δ O.D.	0.027	0.001	0.001	0.001	0.001
N- 計分	0.85	0.03	0.03	0.03	0.03



【圖170】

HCC2279 (外顯子19Del)						
	無變性			在95℃變性1 min		
	E19del	T790M	L858R	E19del	T790M	L858R
	0.04	0.043	0.044	0.05	0.046	0.048
	0.038	0.04	0.04	0.098	0.044	0.046
	-0.002	-0.003	-0.004	0.048	-0.002	-0.002
N- 計分	-0.08	-0.13	-0.17	2.00	-0.08	-0.08

HCC827 (外顯子19Del)						
	無變性			在95℃變性1 min		
	E19del	T790M	L858R	E19del	T790M	L858R
	0.04	0.042	0.042	0.044	0.042	0.041
	0.04	0.038	0.041	0.051	0.04	0.038
	0	-0.004	-0.001	0.007	-0.002	-0.003
N- 計分	0	-0.16	-0.04	0.28	-0.08	-0.12

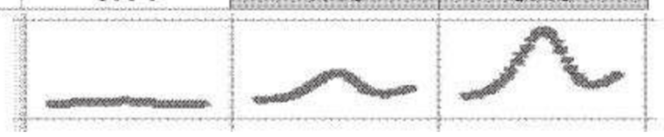
H1975 (T790M, L858R)						
	無變性			在95℃變性1 min		
	E19del	T790M	L858R	E19del	T790M	L858R
	0.041	0.04	0.041	0.046	0.048	0.045
	0.039	0.038	0.041	0.045	0.07	0.061
	-0.002	-0.002	0	-0.001	0.022	0.016
N- 計分	-0.07	-0.07	0.00	-0.03	0.76	0.55

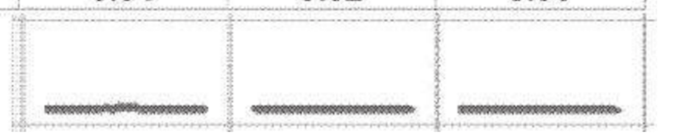
A549 (EGFR 野生型)						
	無變性			在95℃變性1 min		
	E19del	T790M	L858R	E19del	T790M	L858R
	0.043	0.04	0.044	0.04	0.042	0.042
	0.041	0.04	0.042	0.041	0.039	0.039
	-0.002	0	-0.002	0.001	-0.003	-0.003
N- 計分	-0.11	0.00	-0.11	0.06	-0.17	-0.17

【圖171】

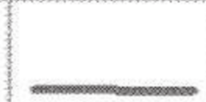
HCC2279 (外顯子19Del)			
	無變性		
	E19del	T790M	L858R
	0.047	0.039	0.04
	0.089	0.041	0.039
	0.042	0.002	-0.001
N- 計分	0.63	0.03	-0.01
			

HCC827 (外顯子19Del)			
	無變性		
	E19del	T790M	L858R
	0.052	0.042	0.04
	0.105	0.04	0.041
	0.053	-0.002	0.001
N- 計分	0.84	-0.03	0.02
			

H1975 (T790M, L858R)			
	無變性		
	E19del	T790M	L858R
	0.04	0.048	0.058
	0.046	0.111	0.209
	0.006	0.063	0.151
N- 計分	0.14	1.43	3.43
			

A549 (EGFR 野生型)			
	無變性		
	E19del	T790M	L858R
	0.039	0.039	0.039
	0.041	0.04	0.039
	0.002	0.001	0
N- 計分	0.04	0.02	0.00
			

【圖172】

HCC2279 (外顯子19Del)			
	無變性		
	E19del	T790M	L858R
	0.052	0.048	0.041
	0.137	0.049	0.042
	0.085	0.001	0.001
N- 計分	1.27	0.01	0.01
			

HCC827 (外顯子19Del)			
	無變性		
	E19del	T790M	L858R
	0.05	0.039	0.04
	0.13	0.039	0.042
	0.08	0	0.002
N- 計分	1.27	0.00	0.03
			

H1975 (T790M, L858R)			
	無變性		
	E19del	T790M	L858R
	0.039	0.049	0.051
	0.04	0.099	0.098
	0.001	0.05	0.047
N- 計分	0.02	1.14	1.07
			

A549 (EGFR 野生型)			
	無變性		
	E19del	T790M	L858R
	0.04	0.039	0.039
	0.043	0.039	0.039
	0.003	0	0
N- 計分	0.06	0.00	0.00
			

【圖173】

202104598

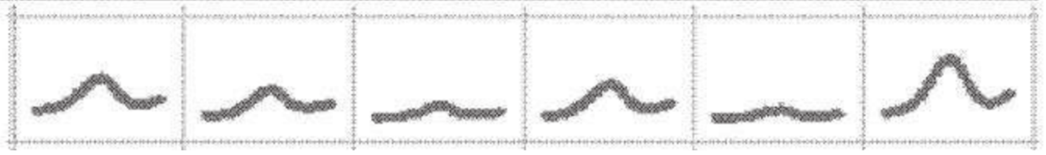
HCC2279 (外顯子19Del)

	DNase 1 μL, 37°C			DNase 2 μL, 37°C		
波長	E19del	T790M	L858R	E19del	T790M	L858R
500	0.043	0.042	0.041	0.046	0.048	0.051
650	0.054	0.047	0.041	0.072	0.093	0.102
	0.011	0.005	0	0.026	0.045	0.051
N- 計分	0.22	0.10	0.00	0.51	0.88	1.00

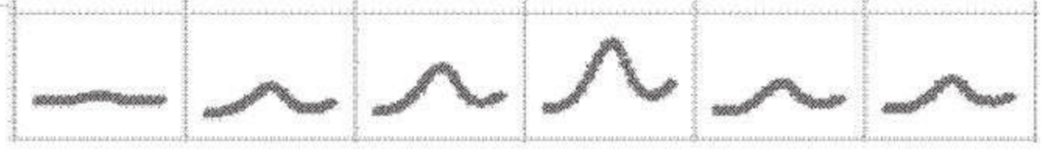
HCC827 (外顯子19Del)

	DNase 1 μL, 37°C			DNase 2 μL, 37°C		
波長	E19del	T790M	L858R	E19del	T790M	L858R
500	0.049	0.049	0.046	0.054	0.044	0.047
650	0.095	0.085	0.078	0.148	0.073	0.093
	0.046	0.036	0.032	0.094	0.029	0.046
N- 計分	0.75	0.59	0.52	1.54	0.48	0.75

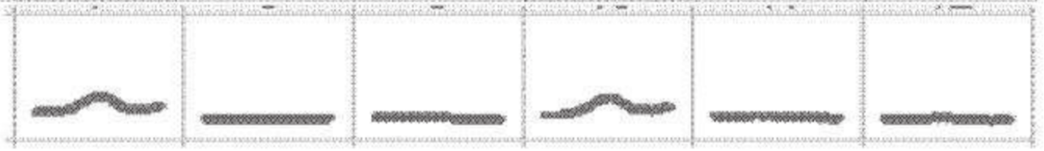
H1975 (T790M, L858R)

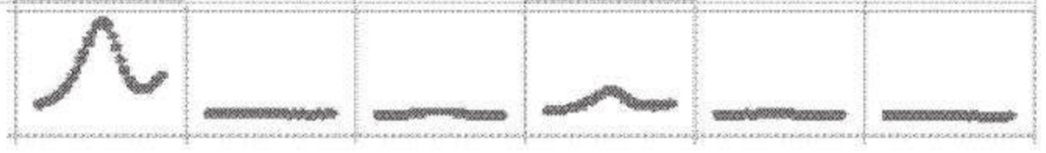
	DNase 1μL, 37°C			DNase 2μL, 37°C		
波長	E19del	T790M	L858R	E19del	T790M	L858R
500	0.054	0.046	0.043	0.046	0.043	0.05
650	0.101	0.084	0.059	0.092	0.055	0.128
	0.047	0.038	0.016	0.046	0.012	0.078
N- 計分	0.87	0.70	0.30	0.85	0.22	1.44
						

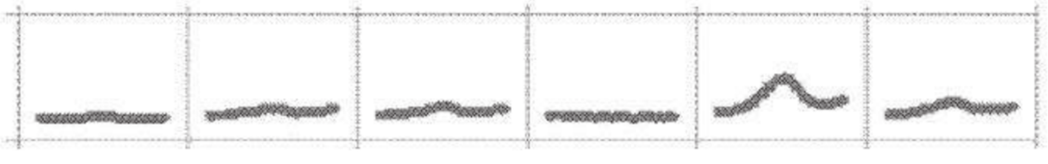
A549 (EGFR 野生型)

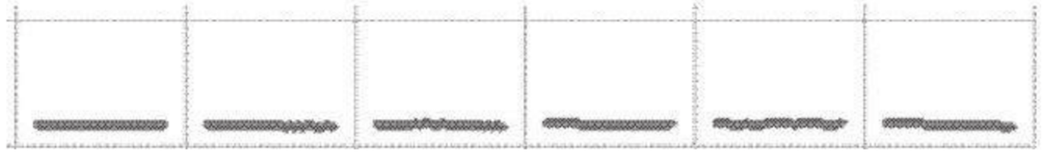
	DNase 1 μL, 37°C			DNase 2 μL, 37°C		
波長	E19del	T790M	L858R	E19del	T790M	L858R
500	0.063	0.045	0.048	0.052	0.049	0.052
650	0.071	0.083	0.112	0.147	0.088	0.093
	0.008	0.038	0.064	0.095	0.039	0.041
N- 計分	0.16	0.75	1.25	1.86	0.76	0.80
						

【圖174】

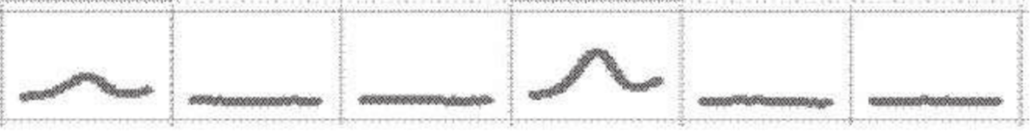
HCC2279 (外顯子19Del)						
	DNase 1 μL, 24℃			DNase 2 μL, 24℃		
波長	E19del	T790M	L858R	E19del	T790M	L858R
500	0.048	0.04	0.041	0.044	0.042	0.04
650	0.072	0.039	0.042	0.068	0.043	0.04
	0.024	-0.001	0.001	0.024	0.001	0
N- 計分	0.47	-0.02	0.02	0.47	0.02	0.00
						

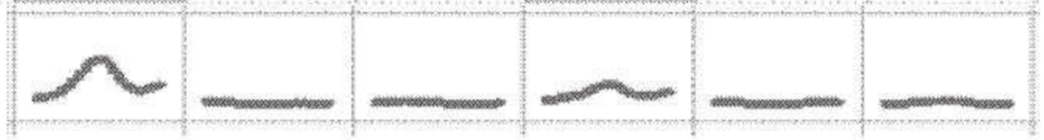
HCC827 (外顯子19Del)						
	DNase 1 μL, 24℃			DNase 2 μL, 24℃		
波長	E19del	T790M	L858R	E19del	T790M	L858R
500	0.055	0.041	0.04	0.045	0.04	0.039
650	0.175	0.042	0.044	0.073	0.042	0.038
	0.12	0.001	0.004	0.028	0.002	-0.001
N- 計分	1.97	0.02	0.07	0.46	0.03	-0.02
						

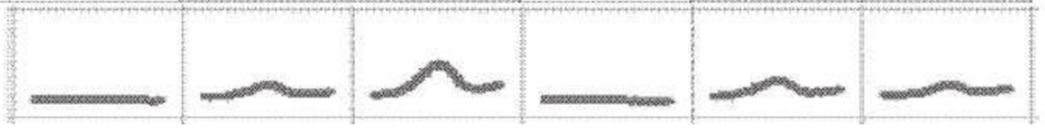
H1975 (T790M, L858R)						
	DNase 1μL, 24℃			DNase 2μL, 24℃		
波長	E19del	T790M	L858R	E19del	T790M	L858R
500	0.04	0.043	0.044	0.043	0.05	0.045
650	0.041	0.054	0.056	0.04	0.097	0.063
	0.001	0.011	0.012	-0.003	0.047	0.018
N-計分	0.02	0.20	0.22	-0.06	0.87	0.33
						

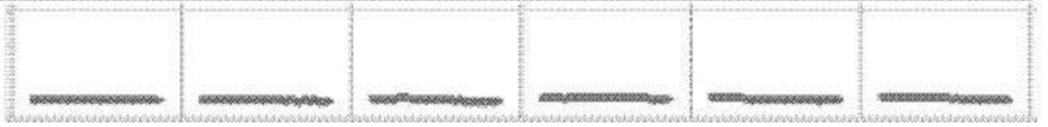
A549 (EGFR 野生型)						
	DNase 1μL, 24℃			DNase 2μL, 24℃		
波長	E19del	T790M	L858R	E19del	T790M	L858R
500	0.04	0.039	0.04	0.041	0.041	0.042
650	0.039	0.037	0.04	0.039	0.042	0.039
	-0.001	-0.002	0	-0.002	0.001	-0.003
N- 計分	-0.02	-0.04	0.00	-0.04	0.02	-0.06
						

【圖175】

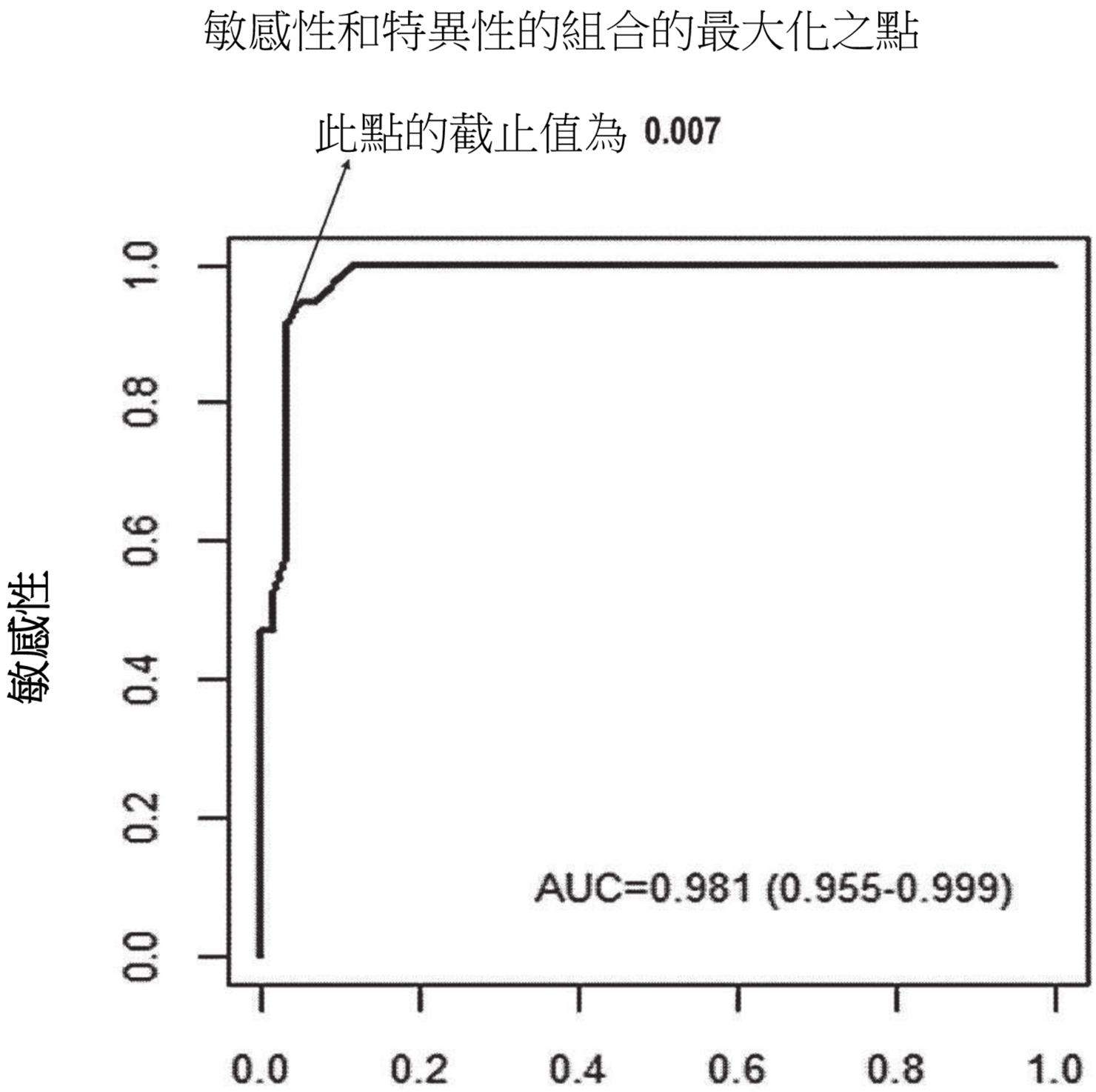
HCC2279 (外顯子19Del)						
	DNase 1 μL, 3°C			DNase 2 μL, 3°C		
波長	E19del	T790M	L858R	E19del	T790M	L858R
500	0.047	0.042	0.041	0.05	0.04	0.04
650	0.083	0.039	0.042	0.122	0.04	0.04
	0.036	-0.003	0.001	0.072	0	0
N- 計分	0.71	-0.06	0.02	1.41	0.00	0.00
						

HCC827 (外顯子19Del)						
	DNase 1 μL, 3°C			DNase 2 μL, 3°C		
波長	E19del	T790M	L858R	E19del	T790M	L858R
500	0.048	0.042	0.041	0.044	0.042	0.04
650	0.116	0.04	0.041	0.071	0.039	0.044
	0.068	-0.002	0	0.027	-0.003	0.004
N- 計分	1.11	-0.03	0.00	0.44	-0.05	0.07
						

H1975 (T790M, L858R)						
	DNase 1 μL, 3°C			DNase 2 μL, 3°C		
波長	E19del	T790M	L858R	E19del	T790M	L858R
500	0.039	0.043	0.047	0.038	0.044	0.047
650	0.038	0.063	0.098	0.038	0.072	0.063
	-0.001	0.02	0.051	0	0.028	0.016
N- 計分	-0.02	0.37	0.94	0.00	0.52	0.30
						

A549 (EGFR 野生型)						
	DNase 1 μL, 3°C			DNase 2 μL, 3°C		
波長	E19del	T790M	L858R	E19del	T790M	L858R
500	0.039	0.039	0.04	0.041	0.042	0.042
650	0.038	0.038	0.038	0.041	0.038	0.042
	-0.001	-0.001	-0.002	0	-0.004	0
N- 計分	-0.02	-0.02	-0.04	0.00	-0.08	0.00
						

【圖176】


敏感性和特異性的組合的最大化之點
此點的截止值為 0.007
敏感性
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
AUC=0.981 (0.955-0.999)
1-特異性

【圖177】